

SUMO: Zelllinienabhängige nukleäre Lokalisierung
des Transkriptionsrepressors PIE-1
in *Caenorhabditis elegans*

Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Ingo Büssing
aus Cloppenburg

1. Referent: Prof. Dr. R. Schnabel

2. Referentin: Prof. Dr. B. M. Jockusch

eingereicht am: 28.04.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.07.2005

2005

(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Ralf Schnabel, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Buessing, I., Kaletta, T., Schmidt, H., Schnabel, H. & Schnabel, R.: Specification of the MS founder cell in *C. elegans*. International *C. elegans* Meeting, Los Angeles USA (2001)

Buessing, I., Kaletta, T., Schmidt, H., Schnabel, H. & Schnabel, R.: *t1530* affects the development of pharynx and body wall muscle and the phagocytosis of cell death. European Worm Meeting, Paestum (Salerno) Italien (2002)

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Schnabel durchgeführt. Herr Prof. Dr. Ralf Schnabel ermöglichte es mir, dass interessante Thema auszusuchen und zu bearbeiten. Die Freiheit, die er mir einräumte, aber auch seine kritischen und wertvollen Kommentare um diese Arbeit auf den richtigen Weg zu bringen, waren eine wertvolle Erfahrung für mich. Die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sind im Besonderen hervorzuheben.

Frau Prof. Dr. Jockusch danke ich für Übernahme des Korreferats. Besonders ihre Arbeit in dem Graduiertenkolleg und ihr Interesse an unserem Wohlergehen waren äußerst beeindruckend.

Herrn Prof. Dr. Arnold danke ich für seine Teilnahme an der Prüfungskommission. Für die ständige Hilfe innerhalb und außerhalb des Labors und die immer guten Beratungen in molekularbiologischen Fragen danke ich Herrn Prof. Dr. Henning Schmidt.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Prof. Dr. Käufer, der immer Interesse an meiner Arbeit zeigte und jederzeit zu Diskussionen bereit war. Außerdem werde ich seine Fragen zu Computerproblemen vermissen. Es war mir immer eine Freude.

Bei Cathrin Struck und Jasmin Fetisch möchte ich mich für alle geleisteten Hilfen und für die vielen Kleinigkeiten, die die Arbeit im Labor erleichterten, bedanken.

Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen danke ich für die Diskussionen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Dem Institut für Pflanzenbiologie von Herrn Prof. Dr. Mendel, insbesondere Herrn Dr. Robert Hänsch, danke ich für die Einführung in das Laser Scanning Mikroskop und die Möglichkeit der Nutzung des Mikroskops.

Für die Bereitstellung von Reagenzien, Stämmen und Plasmiden danke ich Prof. G. Seydoux (Baltimore), Prof. J. Priess (Seattle) und Prof. M. Glotzer (Wien).

Dem Land Niedersachsen danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Internationalen Graduiertenkollegs "Molekülkomplexe von biomedizinischer Relevanz".

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums.

Meiner Frau Christina bin ich ganz besonders dankbar. Durch ihr Verständnis und ihre Unterstützung überstand ich auch schwierige Phasen während dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
Die Suche nach Musterbildungsgenen	3
Der einfache und doch komplexe Nematode <i>C.elegans</i>	3
Embryogenese von <i>C.elegans</i>	4
Spezifizierung von somatischen Gründerzellen	5
Ziele der Arbeit	6
Ergebnisse	7
Phänotypische Analysen der Mutante	7
Immunfluoreszenzfärbungen	7
Laserablationen	9
Zelllinienanalyse mit der 4D-Mikroskopie	11
Temperaturabhängigkeit des Phänotyps	15
Apoptotische Zellen in der <i>ulp-1 (t1530)</i> Mutante	17
Theoretischer Hintergrund	17
Apoptose in der <i>ulp-1 (t1530)</i> Mutante	19
Morphologie der apoptotischen Zellen	23
Das Gen <i>ulp-1</i> kodiert für eine Protease	25
De-Ubiquitinierungsassay	29
Theoretischer Hintergrund zum SUMO-Pathway	31
Mutanten bzw. RNAi von Genen aus dem SUMO Pathway	34
Das Deletionsallel <i>smo-1 (ok359)</i>	34
Posttranskriptionelle Inaktivierung von <i>smo-1</i> und <i>ubc-9</i>	35
Apoptotische Zellen in verschiedenen RNAi Embryonen	37
Lokalisierung von ULP-1 und SMO-1	39
Expression des Fusionsproteins ULP-1::GFP	40
ULP-1::GFP auf einen YAC	43
Expression des Fusionsproteins GFP::SMO-1	46
(Über-) Expression von reifen SUMO in der Mutante <i>ulp-1 (t1530)</i>	48
Theoretischer Hintergrund PIE-1	52

PIE-1 als mögliches Zielprotein für die SUMOylierung?	53
PIE-1::GFP Expression im Wildtyp Hintergrund	53
PIE-1::GFP im <i>ulp-1</i> (<i>t1530</i>) Hintergrund	57
PIE-1 Antikörper	63
Expression des mutanten Fusionsproteins PIE-1::GFP K68A	66
PIE-1::GFP K68A im <i>pha-1</i> Hintergrund	66
PIE-1::GFP K68A im <i>pie-1</i> Hintergrund	73
PIE-1::GFP in <i>smo-1</i> (<i>ok359</i>)	73
Diskussion	76
SUMO und Apoptose	77
Regulation der Phagozytose oder der Apoptose?	77
SUMO als Antagonist zu Ubiquitin in der Apoptose?	79
SUMOylierung - DeSUMOylierung, gleicher Effekt?	80
Ausblick: Zielprotein mit Funktion in der Apoptose?	81
Keimbahnentwicklung	82
Sterilität in der <i>smo-1</i> Deletionsmutante	82
Spezifizierung der frühen Blastomeren	84
Regulation des PIE-1 Proteins durch SUMOylierung	84
PIE-1 in der <i>ulp-1</i> (<i>t1530</i>) Mutante	86
Erklärt die PIE-1 Misslokalisierung den <i>ulp-1</i> Phänotyp?	89
Die komplexe Embryogenese von <i>C.elegans</i>	91
Material und Methoden	92
Literatur	124
Anhang	131

Zusammenfassung

Immunochemische und 4D-mikroskopische Analysen des Phänotyps der embryonal letalen Mutante *ulp-1* (*t1530*) des Nematoden *C.elegans* zeigen eine fehlerhafte Spezifizierung der somatischen Gründerzellen MS, C und D in der frühen Embryogenese. Eine zweite pleiotrope Funktion des Gens betrifft die Ausführung der Apoptose und/oder der Phagozytose embryonaler Zellen. Diese zunächst überraschende Komplexität des Phänotyps konnte durch die molekulare Identität des Gens erklärt werden. Das Gen *ulp-1* kodiert für eine SUMO spezifische Protease, die durch Abspaltung des SUMO Proteins eine posttranslationale Modifikation durch SUMO revertiert.

Das Protein hat damit eine „generelle“ regulatorische Funktion, die die nicht offensichtlich miteinander korrelierten Phänotypen erklären kann. Diese generelle Funktion behinderte zunächst jedoch eine Aufklärung der Funktion des Gens bei der Spezifizierung der somatischen Gründerzellen, da es keinerlei Hinweis auf das Zielprotein der SUMOylierung gab. Jedoch wurde dann durch (Über-)expression des reifen SUMO Proteins in der *ulp-1* Mutante das keimbahnspezifische Protein PIE-1 als ein Zielprotein der SUMOylierung identifiziert. PIE-1 unterdrückt die Transkription in Keimbahnzellen, was essentiell für ihre Spezifizierung ist. Wie hier gezeigt, reguliert die SUMOylierung von PIE-1 die subzelluläre Lokalisation des Proteins. Das nicht SUMOylierte Protein liegt im Cytoplasma, das SUMOylierte im Kern vor. Die Entdeckung, dass die Aktivität von PIE-1 durch eine differenzielle Lokalisation im Kern und Cytoplasma reguliert wird, erlaubt es, die Funktion von *ulp-1* bei der Spezifizierung der Gründerzellen zu erklären. Die Protease verhindert normalerweise die Kernlokalisierung des nach einer stammzellartigen P-Teilung zurückbleibenden PIE-1 Proteins und damit die generelle Repression der Transkription in der somatischen Zelle. Der Defekt, zum Beispiel in der MS Zelle, entsteht in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante durch eine Repression der zur Expression des Schicksals notwendigen Transkription.

Eine detaillierte phänotypische Analyse der fehlerhaften Apoptose zeigte, dass die nicht phagozytierten Zelltode den Sterbeprozess auf halbem Weg beenden und diese möglicherweise deshalb nicht phagozytiert werden. Da die Inaktivierung eines Gens des Ubiquitin-Pathways (*zif-1*) zu vergleichbaren morphologischen Veränderungen in den apoptotischen Zellen wie *ulp-1* (*t1530*) führt, könnte die SUMOylierung hier antagonistisch zur Ubiquitinierung wirken.

Einleitung

Die Embryogenese eines mehrzelligen Organismus ist ein faszinierender Vorgang. Die Frage, wie aus einer einzelnen totipotenten Eizelle ein Organismus mit seinen verschiedenen Geweben und den unterschiedlichsten Formen entsteht, ist wohl für die meisten Entwicklungsbiologen die Motivation für ihre Arbeit. Die Koordination und das Zusammenspiel der vielen Gene, die für die Entwicklung wichtig sind, sind ein spannender Aspekt der Entwicklungsbiologie. Wie schafft es ein Organismus immer genau an der richtigen Position und zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Entscheidungen in einer Zelle zu treffen? Warum wird aus der einen Zelle eine Hautzelle, aber aus ihrer Schwester eine Nervenzelle? Warum wandern bestimmte Zellen über weite Distanzen, aber andere bleiben vor Ort? All diese und unzählige weitere Fragen ergeben sich bei der Beobachtung eines sich entwickelnden Organismus. Fragen dieser Art zu lösen ist eine herausfordernde Aufgabe.

Die Analyse von Mutanten, die Defekte in der Entwicklung aufweisen, stellt eine elegante Methode dar, die Funktion einzelner Gene zu beschreiben. Maternale Komponenten haben besonders für die frühe Embryogenese einen entscheidenden Einfluss, was durch die Analysen von maternal letalen Mutanten gezeigt wurde. Die Forschungen an *Drosophila melanogaster* waren hier federführend (Nusslein-Volhard *et al.*, 1980). Die Suche nach maternal letalen Mutanten in anderen Modellorganismus folgte (Droin, 1992; Kemphues *et al.*, 1988; Kemphues *et al.*, 1986; Priess *et al.*, 1987, Schnabel, nicht publiziert). Diese Forschungen trugen einen Großteil zu dem heutigen Verständnis der frühen Embryonalentwicklung bei, und deckten verschiedene Prinzipien der Musterbildung auf.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte im Bereich der Entwicklungsbiologie erzielt. Dennoch sind viele Fragen ungeklärt und viele Gene noch nicht identifiziert, die wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung haben.

Die Suche nach Musterbildungsgenen

Die Entstehung eines mehrzelligen Organismus beinhaltet die Generation von komplexen Strukturen. Die Zuverlässigkeit mit der dieser Prozess durchgeführt wird, wird durch die Ähnlichkeit von Zwillingen anschaulich. Die Grundlage der komplexen Strukturen ist die während der Entwicklung ablaufende Musterbildung. Die Gestaltung verschiedener Strukturen eines Lebewesens setzt voraus, dass Zellen, die alle aus einer Zygote entstehen, unterschiedliche Aufgaben ausführen, die aber das identische genetische Material enthalten. Dies führt zu der Frage, durch welche Prozesse sich die Zellen eines Organismus voneinander unterscheiden?

Grundlegende Konzepte, wie die „Positionsinformation“ (Wolpert, 1969) oder embryonaler „Organisator“ („Spemann-Mangold organizer“) stammen aus Experimenten, in denen die normale Entwicklung beeinflusst wurde. Heute ist das Interesse sehr groß, solche Prozesse der Musterbildung auf molekularer Ebene zu verstehen. Die Genetik ist dafür eine elegante Methode. In vielen Organismen wurden und werden immer noch Mutantenlesen nach verschiedenen Phänotypen durchgeführt. Die Aufgabe solche Mutanten zu charakterisieren und die unterliegenden molekularen Regulationsmechanismen aufzuklären wird weltweit in vielen entwicklungsbiologischen Laboren verfolgt.

Der einfache und doch komplexe Nematode *C.elegans*

Im Jahr 1965 wählte Sydney Brenner *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus aus um die Entwicklung und das Verhalten des Nematoden zu studieren (Brenner, 1973). Er erhoffte sich, das Nervensystem des „einfachen“ Wurmes aufzuklären. Für seine bedeutsamen Arbeiten zur Organentwicklung wurde er im Jahr 2002 mit dem Nobelpreis geehrt. Dass das Nervensystem (381 Zellen) bis heute nicht mal näherungsweise aufgeklärt ist, zeigt deutlich, dass das Problem komplexer ist als angenommen. Sydney Brenner konnte bereits 1974 über 100 Genloci präsentieren, die das Verhalten und die Morphologie des adulten Tieres beeinflussen (Brenner, 1974). Er dachte einen großen Teil der dafür notwendigen Gene identifiziert zu haben, da er vermutete, dass der Wurm überhaupt nur 2000 Gene besitzt. Heute wissen wir nun, dass es ca. 20.000 sind.

Embryogenese von *C.elegans*

Für Entwicklungsbiologen ist der Wurm aus verschiedenen Gründen interessant. Die Entwicklung lässt sich unter dem Mikroskop wegen der Durchsichtigkeit des Embryos gut verfolgen (Schnabel *et al.*, 1997; Sulston *et al.*, 1983). Die fast invariante Zelllinie ist für die Analyse von Veränderungen äußerst günstig. Sulston *et al.* konnten 1983 den Zellstammbaum des Embryos aufstellen, indem sie über Jahre hinweg die einzelnen Zellen durch ein Mikroskop verfolgten. Das Aufstellen des Zellstammbaums konnte in den folgenden Jahren durch die Technik des 4D-Mikroskops und entsprechenden Programmen zur Auswertung kontinuierlich verbessert werden (Schnabel *et al.*, 1997). Mit dem Aufstellen eines Zellstammbaums einer Mutante können heute in relativ kurzer Zeit die Phänotypen von embryonal letalen Mutanten analysiert werden und in dieser Arbeit wird ein Beispiel dafür gebracht.

Die Embryogenese von *C.elegans* teilt sich in 3 Hauptphasen auf (Wood, 1988). Die erste beinhaltet die Achsenbildung und die Determination der somatischen Gründerzellen. Die Gastrulation, die Zellproliferation und die beginnende Zelldifferenzierung zählen zu der zweiten Phase. In der dritten Phase kommt es zum Abschluss der Zelldifferenzierung und zur Morphogenese, diese Phase und damit auch die Embryogenese wird durch das Schlüpfen der Larve abgeschlossen. In der frühen Phase der Embryogenese bringt die Zygote (P_0) die Gründerzellen AB, MS, E, C und D, sowie die Keimbahnvorläuferzelle P_4 hervor (Abbildung 1). Diese Arbeit charakterisiert molekulare Grundlagen der Differenzierung zwischen den somatischen und den stammzellartigen P-Zellen.

Die Komplexität des Nematoden *C.elegans* wird auch in der Spezifizierung der Gewebetypen deutlich. Die einzelnen Gewebe werden mosaikartig aus den verschiedenen somatischen Gründerzellen abgeleitet. Die einzige Ausnahme stellt die Gründerzelle E als Darmvorläufer dar (Abbildung 1).

Auch dieser Aspekt ist später zum Verständnis meiner Arbeit und Resultate wichtig.

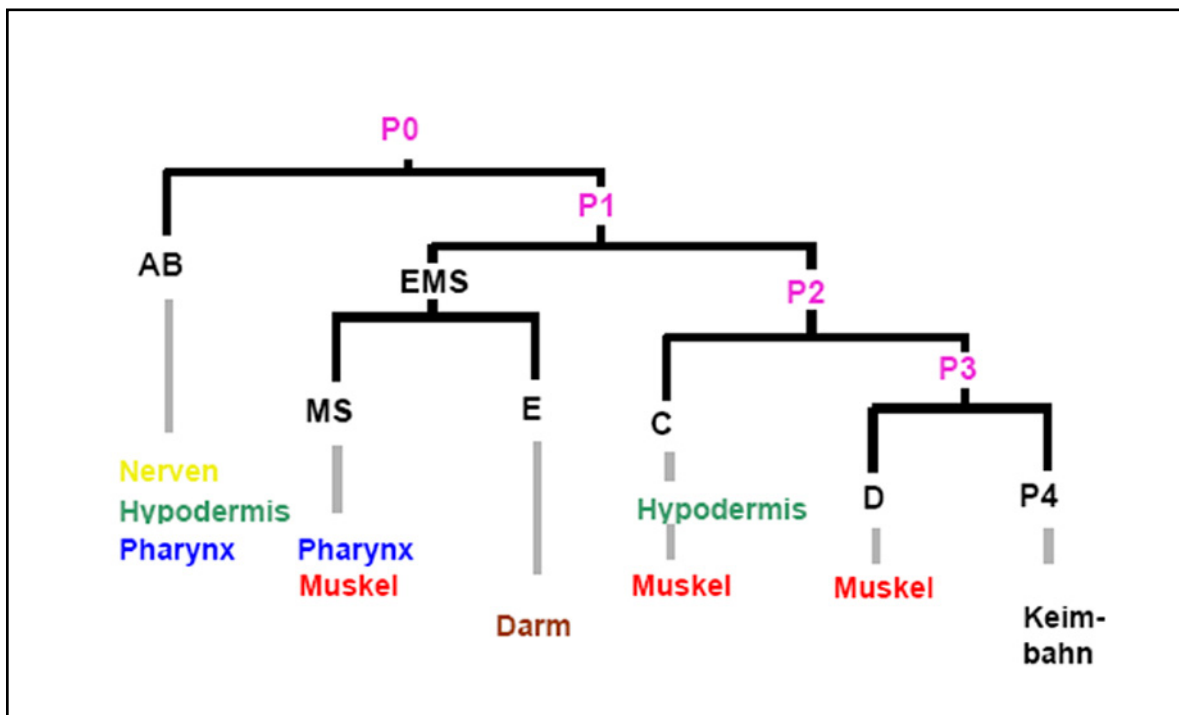


Abbildung 1: Frühe Zelllinie von *C.elegans* und die aus den Gründerzellen entstehenden Gewebe. In einer Folge von stammzellähnlichen, asymmetrischen Zellteilungen werden die somatischen Gründerzellen und der Keimbahnvorläufer P_4 gebildet. Die wichtigsten Gewebe, die aus den jeweiligen Gründerzellen gebildet werden, sind angegeben.

Spezifizierung von somatischen Gründerzellen

Nach 100 Jahren Nematodenforschung galt die Embryogenese als weitestgehend autonom. Dies musste durch genaue Analyse mit Hilfe von Mutanten und Laserablationen in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts revidiert werden. Gerade in der frühen Entwicklung werden Blastomeren durch Induktionen determiniert (Schnabel, 1996).

Die Signalwege (z.B. Delta/Notch oder Wnt), die zur Determination von einzelnen AB Blastomeren führen, sind größtenteils bekannt und auch in anderen Organismen an Musterbildungsprozessen beteiligt. Von den Musterbildungs- genen, die in der Spezifizierung der weiteren Blastomeren (MS, E, C und D) involviert sind, sind bisher nur wenige bekannt.

Titus Kaletta identifizierte in seiner Doktorarbeit in diesem Labor drei Kandidaten für Musterbildungsgene aus einer Kollektion von maternal letalen Mutanten auf Chromosom III (Kaletta, 1998). Das Gen *lit-1* (*t1512*) ist unter anderem für die Spezifizierung der Blastomere E essentiell (Kaletta *et al.*, 1997). Das Gen *inx-1* (*t1460*) galt als Kandidat für die Spezifizierung der C Blastomere und kodiert für ein Protein der Innexin Familie (Starich *et al.*, 2001). Von einer dritten Mutante (*t1530*) wurde vermutet, dass das Gen für die Spezifizierung der MS Blastomere benötigt wird (Kaletta, 1998). Diese Mutante wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit weiter charakterisiert (Büssing, 2000) und ist die Grundlage für diese Arbeit.

Ziele der Arbeit

Der Phänotyp der Mutante (*t1530*) sollte mit verschiedenen Methoden (wie der Zelllinienanalyse) näher charakterisiert werden. Die Hypothese der defekten Spezifizierung der MS Blastomere sollte kritisch verfolgt werden. Wenn durch den Phänotyp gerechtfertigt, sollte das in der Mutante betroffene Gen kloniert werden, um so auch die molekularen Zusammenhänge der unterliegenden Prozesse zu verstehen.

Nachdem das durch *t1530* definierte Gen kloniert war, ergaben sich aus der zunächst überraschenden molekularen Identität des *ulp-1* Gens, das für eine SUMO spezifische Protease kodiert und damit eine eher „generelle“ regulatorische Funktion in der Zelle einnimmt, weiterführende Fragen. So stellte sich beispielsweise die Frage, für welchen Regulationsprozess die SUMOylierung so früh im Embryo gebraucht wird, dass solch ein spezifischer Phänotyp auftritt.

Ergebnisse

Die maternal letale Mutante *ulp-1* (*t1530*) wurde in einer Mutantenlese für Chromosom III von der Arbeitsgruppe von Ralf Schnabel isoliert. Titus Kaletta stellte nach ersten Experimenten die interessante Hypothese auf, dass das Gen für die Spezifizierung der MS Blastomere wichtig ist und als Kandidat für ein Musterbildungsgen gelten kann (Kaletta, 1998).

Phänotypische Analysen der Mutante

In ersten phänotypischen Analysen wurde die *ulp-1* (*t1530*) Mutante zunächst mit Hilfe verschiedener Methoden (Immunfluoreszenz, Zellstammbaumanalyse) charakterisiert. Der Name *ulp-1* („ubiquitin like protease“) leitet sich von der Funktion des Proteins ab, das, wie sich später herausstellte, eine Protease Aktivität besitzt, um ein ubiquitin-ähnliches Protein von einem kovalent gebundenen Substrat abzuspalten.

Immunfluoreszenzfärbungen

Die Mutante wurde zu Beginn mittels Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Diese ersten Analysen geben einen Einblick in die in der Mutante betroffenen Gewebe und damit auch in die betroffenen Zelllinien, aus denen diese Gewebe entstehen. Zu diesem Zweck wurden drei monoklonale Antikörper verwendet, die Proteine detektieren, die spezifisch für Darmzellen (ICB4), Pharynxmuskelzellen (3NB12) bzw. Körpermuskelzellen (NE8 4C6.3 oder 5-6) sind. Für diese drei Antikörper ist die genaue Anzahl und Art der detektierbaren Zellen im embryonalen Zellstammbaum bekannt. Jede der fünf Gründerzellen trägt mit einer bestimmten Anzahl an Zellen zu diesen Geweben bei. Die E-Blastomere zu allen 20 Darmzellen, die Zellen ABa und MS mit sieben bzw. vierzehn Zellen zu den Pharynxmuskelzellen. Die Körpermuskelzellen entstehen aus AB (eine Zelle), MS (28 Zellen), C (32 Zellen) und D (20 Zellen). Durch eine Veränderung der Anzahl an gefärbten Zellen in Kombination mit den verschiedenen Antikörpern lassen sich erste Hinweise auf eine möglicherweise nicht korrekt spezifizierte Gründerzelle gewinnen.

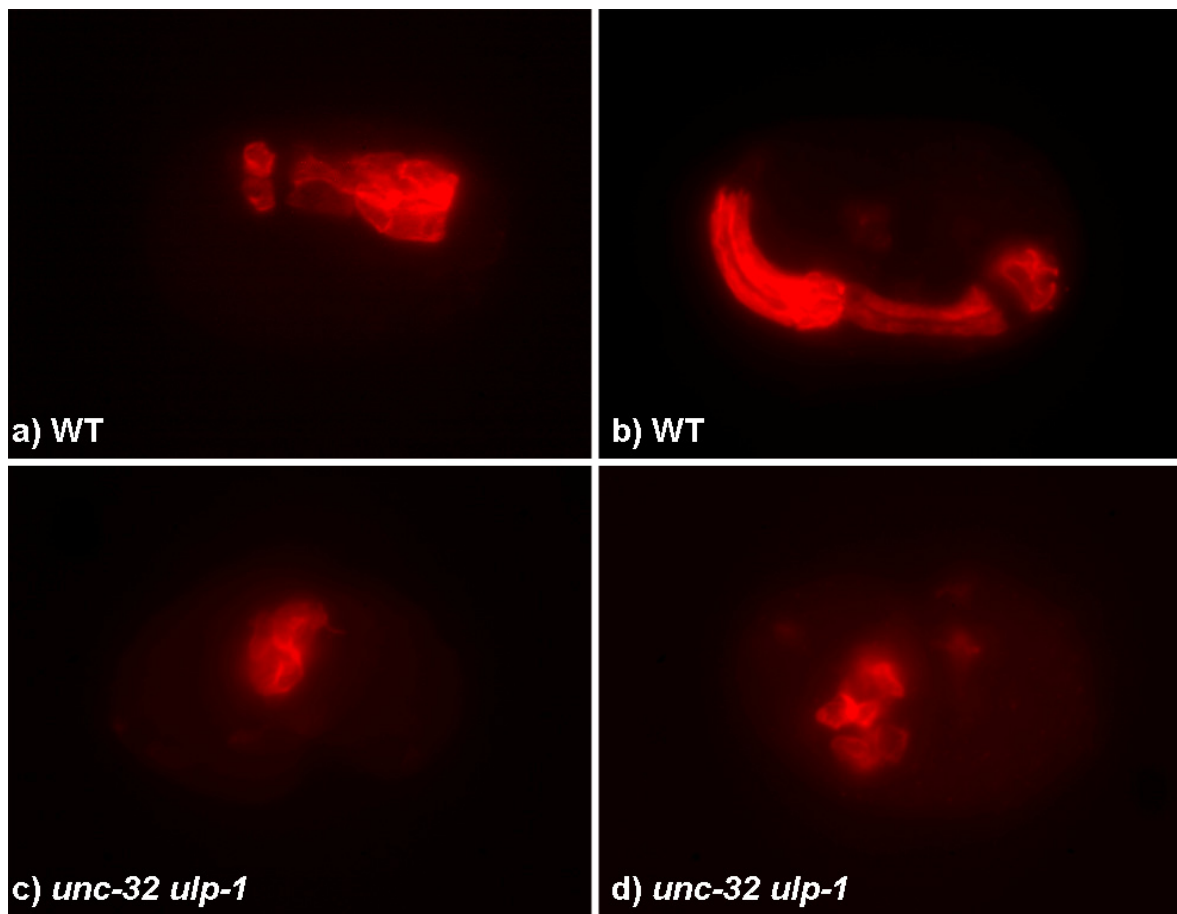


Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Antikörper 3NB12. a) und b) zeigen Wildtyp Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien {a) 1,5-fach Stadium; b) 3-fach Stadium}. In beiden Embryonen sind jeweils 21 Pharynxmuskelzellen gefärbt. Durch die Morphogenese ist der Pharynx in b) elongiert. In c) und d) sind Beispiele für die verringerte Anzahl an Pharynxmuskelzellen in Embryonen von homozygoten *ulp-1* Hermaphroditen dargestellt. Es kommt nicht zur Elongation des Pharynx, da die Embryonen während der Morphogenese arretieren. Es ist eine Fokusebene für jeden Embryo dargestellt. Für die Bestimmung der Anzahl der gefärbten Zellen wurde durch die Embryonen fokussiert.

Die zunächst von Titus Kalleta durchgeführten und von mir bestätigten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Embryonen von homozygoten *ulp-1* (*t1530*) Hermaphroditen eine normale Anzahl an Darmzellen (20 Zellen) und eine verringerte Anzahl sowohl an Pharynxmuskelzellen, als auch an Körpermuskelzellen aufweisen (Abbildung 2). Die normalerweise 21 Pharynxmuskelzellen sind auf 6 ± 2 Zellen ($n=22$), die Körpermuskelzellen von 81 auf 37 ± 10 Zellen ($n=33$) reduziert. Es konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass eine möglicherweise

fehlerhafte Spezifizierung der MS Blastomere, die 14 der 21 Zellen Pharynx-muskelzellen hervorbringt, vorliegt (Kaletta, 1998). Grundlage für die Hypothese war vor allem die Anzahl der fehlenden Pharynxmuskelzellen.

Laserablationen

Es wurden Laserablationen durchgeführt, da durch die bisherigen Immunfluoreszenzfärbungen nicht gezeigt werden konnte, ob die noch entstehenden Pharynxmuskelzellen ausschließlich von ABa bzw. von MS oder aber von beiden Blastomeren gebildet werden. In diesen Experimenten wurden einzelne Blastomere (ABa) bzw. die Nachkommen einer Blastomere (MSa und MSp) mit einem Laser ablatiert, so dass sie nicht mehr zu den entstehenden Pharynxmuskelzellen beitragen können. Im Falle der MS Blastomere wurden erst die Tochterzellen MSa und MSp ablatiert, da die MS Blastomere selbst den Pharynxmuskel in der ABa Zelllinie induziert (Hutter und Schnabel, 1994). Wird die ABa Blastomere in den mutanten Embryonen ablatiert, entstehen vier Pharynxmuskelzellen, bei Ablation der MSa und MSp Zellen können noch zwei Zellen mit dem Antikörper 3NB12 detektiert werden (Tabelle 1 und Abbildung 3).

Tabelle 1: Ergebnisse der Laserablationsexperimente. Es ist jeweils die Anzahl der Zellen angegeben, die mit dem Antikörper 3NB12, der spezifisch ein Protein der Pharynxmuskelzellen erkennt, gefärbt wurden. Für die *ulp-1 (t1530)* Mutante sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung angegeben.

	ohne Ablation	ABa Ablation	MSa/MSp Ablation
Wildtyp	21	14	7
<i>unc-32 ulp-1</i>	6 ± 2	4 ± 1	2 ± 1

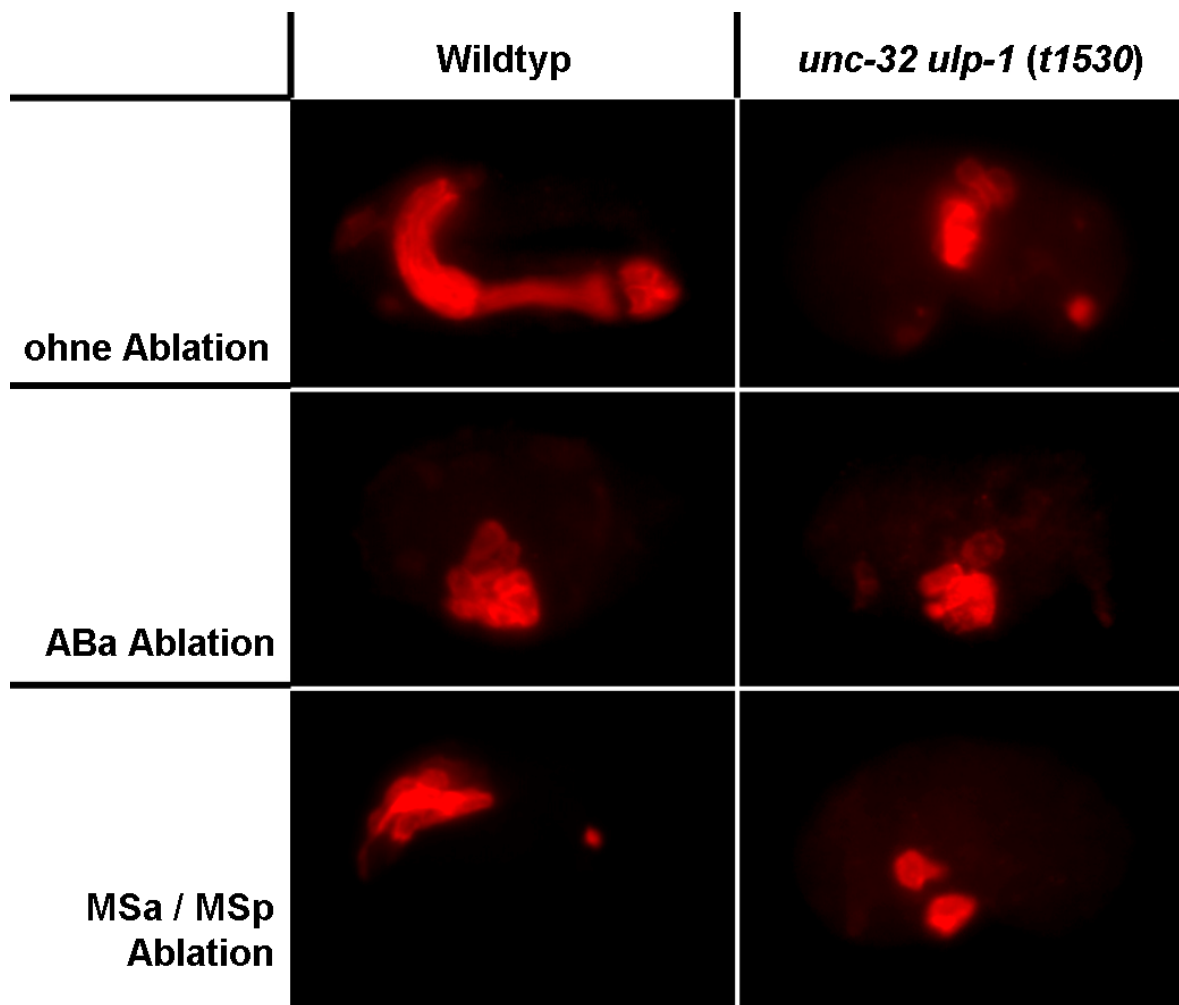


Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbungen von ablatierten und nicht ablatierten Embryonen. In der linken Spalte sind die 3NB12 Färbungen von Wildtyp Embryonen gezeigt, in der rechten Spalte die *ulp-1 (t1530)* Mutante. Die Embryonen in der ersten Reihe wurden nicht ablatiert. In der mittleren Reihe sind Embryonen dargestellt, in denen die ABa Blastomere ablatiert wurde. In der unteren Reihe wurden die Nachkommen der MS Blastomere (MSa/MSp) in der frühen Entwicklung ablatiert.

Die Ergebnisse der Laserablationen zeigen, dass beide Gründerzellen, MS und ABa, zu den in der Mutante gefundenen reduzierten Pharynxmuskulazellen beitragen. Dieses widerlegt allerdings nicht die von T. Kaletta aufgestellte Hypothese, dass das mutierte Gen für die Spezifizierung der MS Blastomere wichtig ist, da der von ABa abgeleitete Anteil der Pharynxmuskulazellen von einer Induktion ausgehend von der MS Blastomere abhängig ist (Hutter und Schnabel, 1994). Sowohl MS als auch ABa bringen noch Pharynxmuskulazellen hervor. Beide Zellen haben

also ihre Identität nicht vollständig durch die Mutation verloren, sondern führen ihr Schicksal noch partiell aus. Die in ABa ermittelten Defekte können dabei ein Resultat der Defekte in der MS Zelle sein. Es kann zu einer partiellen Induktion der Pharynxmuskelzellen in der ABa Zelllinie kommen, wenn die MS Blastomere durch die Mutation nicht vollständig spezifiziert wird. Eine solche partielle Induktion für den von ABa abgeleiteten Pharynxmuskelzellen konnte schon von Hutter und Schnabel (1994) durch Ablationen der MS Blastomere zu unterschiedlichen Zeitpunkten beschrieben werden. Die Ergebnisse sind mit der Hypothese zu vereinbaren, dass eine partielle Induktion in der untersuchten *ulp-1 (t1530)* Mutante vorliegen könnte.

Zelllinienanalyse mit der 4D-Mikroskopie

Der Zellstammbaum des Nematoden *Caenorhabditis elegans* erlaubt es die gesamte Embryonalentwicklung auf Einzelzellebene zu betrachten (Schnabel *et al.*, 1997; Sulston *et al.*, 1983). Ebenso liefert eine Zelllinienanalyse umfassende Information bezogen auf die einzelnen Schicksale von Blastomeren einer Mutante. Die vorher beschriebenen Immunfluoreszenzfärbungen zeigen nur die einzelnen betroffenen Gewebe und sind immer auf ein bestimmtes Stadium beschränkt. Die Zelllinienanalyse mit Hilfe der 4D-Mikroskopie erlaubt die Analyse der gesamten Embryogenese.

Für die Zelllinienanalyse werden verschiedene Kriterien betrachtet. Zum einen können Schicksalstransformationen durch die Zellteilungsmuster und spezifischen Differenzierungsmuster (z.B. Zelltode) in den Nachkommen jeder Blastomere erkannt werden. Zum anderen können Positionen von Nachkommen einzelner Gründerzellen im prämorphogenetischen Stadium (ca. 350 bis 400 Zellen) einen Aufschluss über die Schicksale geben. In Mutanten, in denen einzelne Blastomere veränderte Schicksale aufweisen, wandern die Nachkommen dieser Blastomeren zu Positionen, die ihrem neuen Schicksal entsprechen (Schnabel *et al.*, 1997). Das Programm SIMI°BioCell ermöglicht eine 3-dimensionale Darstellung der analysierten Embryonen. Damit können die Zellpositionen in der Mutante mit den Zellpositionen des Wildtyps verglichen werden.

Um die Ergebnisse der Antikörperfärbungen zu unterstützen bzw. um weitere phänotypische Charakteristika der Mutante *ulp-1 (t1530)* zu identifizieren, wurden Zelllinienanalysen der letalen Embryonen durchgeführt.

In Embryonen von homozygoten *ulp-1 (t1530)* Hermaphroditen ließen sich bis auf einige kleine aber signifikante Defekte, die noch näher beschrieben werden, keine generellen Schicksalstransformationen in der Zelllinie feststellen. Allerdings zeigt ein Teil der Nachkommen der ABalp-Zelle im prämorphogenetischen Stadium eine veränderte Position im Vergleich zu den Zellen im Wildtyp (Abbildung 4). Diese Zellen bilden normalerweise einen Teil des Pharynx und auch zwei derjenigen Pharynxmuskelzellen, die von dem Antikörper 3NB12 erkannt werden (Priess und Thomson, 1987).

Die auffälligsten Positionsunterschiede sind in der MS Zelllinie zu erkennen. In Abbildung 4 sind nur die Nachkommen der MS-Blastomere dargestellt. Die Embryonen sind von der dorsalen Seite zu sehen. Die von der MS-Blastomere gebildeten Subregionen nehmen im Wildtyp eine geordnete Form ein. Die vier Subregionen bilden jeweils eine Schicht im Embryo. In der Mutante mischen sich die Zellen der einzelnen Subregionen. Die vier Schichten bilden sich nicht eindeutig aus.

Die Beobachtungen in den Positionsunterschieden der Zellen im prämorphogenetischen Stadium unterstützt die Hypothese aus den Immunfluoreszenzfärbungen und den Laserablationsexperimenten, dass zumindest die MS-Blastomere und ihre abhängigen Schicksale in den AB Nachkommen in der *ulp-1* Mutante betroffen sind. Diese Ergebnisse unterstützten ebenfalls die Hypothese der partiellen Induktion, da die Defekte in der AB Zelllinie nur in den Nachkommen der ABalp Blastomere zu beobachten sind. Das Schicksal dieser Zellen ist abhängig von einer Induktion ausgehend von der MS Blastomere.

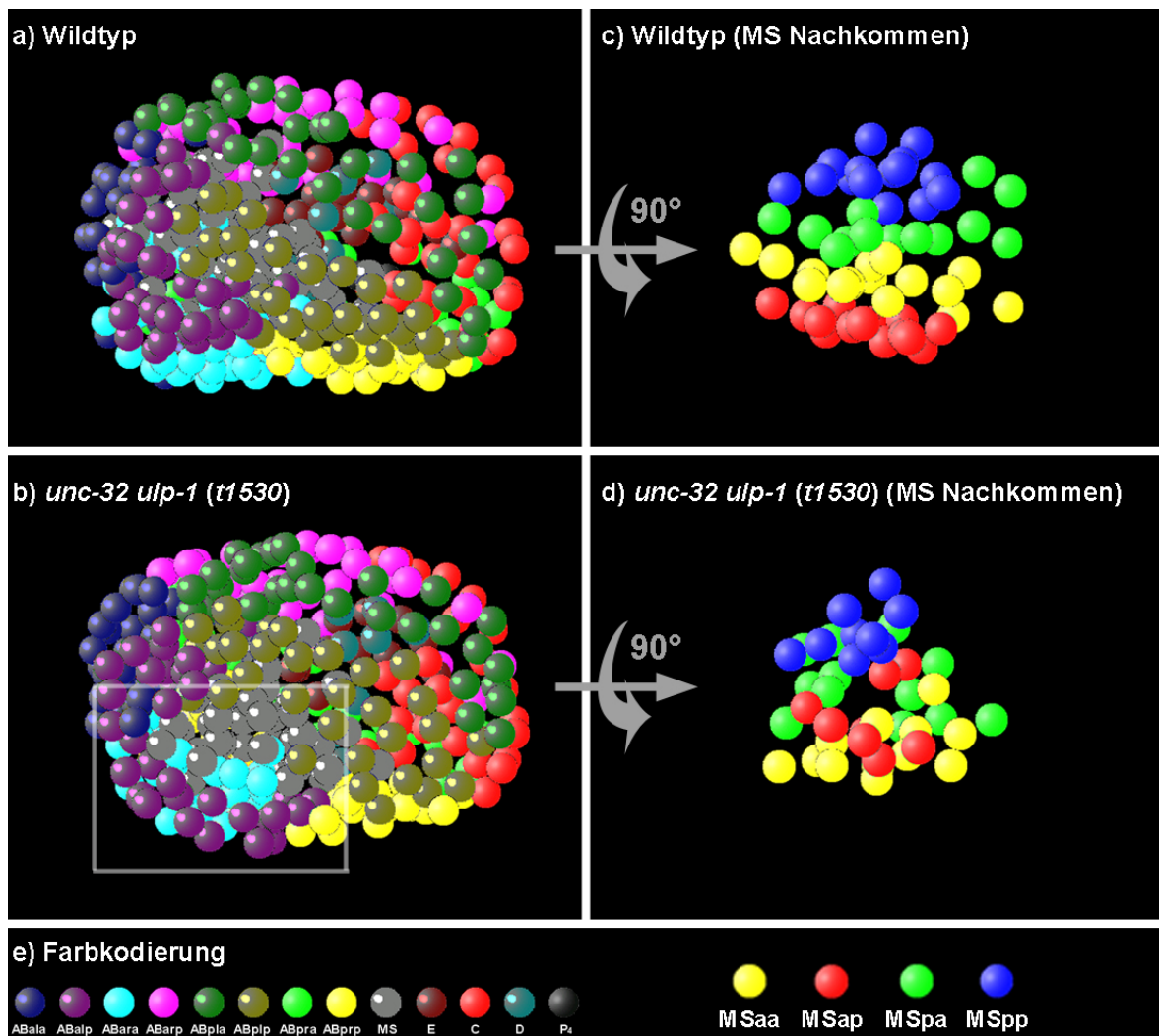
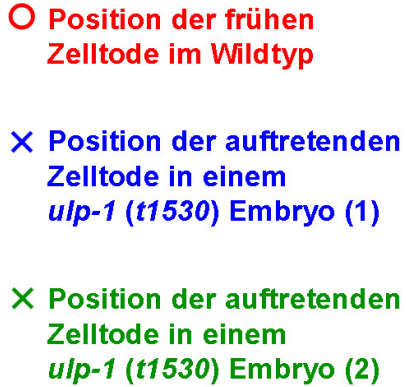


Abbildung 4: 3D-Repräsentation eines Wildtyp und eines *ulp-1 (t1530)* Embryos im prämorphogenetischen Stadium (ca. 350 Zellen). Die in dem Programm SIMI°BioCell markierten Zellen werden in dieser Darstellung durch einzelne Kugeln repräsentiert. In **a)** und **b)** sind alle Zellen der Embryonen dargestellt. Die Nachkommen der Zellen, die im 12-Zell Stadium präsent sind, wurden mit der in **e)** angegebenen Farbkodierung eingefärbt. In der Mutante sind Nachkommen der ABalp Zelle nicht an der richtigen Position, wo sie im Wildtyp platziert sind (grauer Rahmen). In **c)** und **d)** sind jeweils nur die Nachkommen der MS Blastomere dargestellt. Die verwendete Farbkodierung ist unterhalb in **e)** angegeben. Die Embryonen wurden im Vergleich zu **a)** und **b)** um 90° um die anterior-posterior Achse gedreht. Im Gegensatz zu den Zellen der MS Blastomere im Wildtyp mischen sich die Subregionen in der Mutante.

Ein weiterer Hinweis auf eine partielle Induktion konnte durch die Zelllinienanalyse gefunden werden (Abbildung 5). Die Zellen ABara und ABalp behalten ihre „Grundschicksale“, wenn die angesprochene Induktion ausgehend von MS vollständig unterbunden ist (z.B. in der Mutante *glp-1* oder durch frühe Ablation der MS Blastomere). Diese Grundschicksale entsprechen dann den linken bzw. rechten homologen Blastomeren dieser Zellen. Als Resultat führt die Zelle ABara das Schicksal von ABala und die Zelle ABalp das ABarp Schicksal aus (Hutter und Schnabel, 1994; Hutter und Schnabel, 1995). Ein zusätzlicher Zelltod in der ABalp Zelllinie wurde in zwei der analysierten homozygoten *ulp-1* (*t1530*) Embryonen gefunden (Abbildung 5). Im Wildtyp tritt an dieser Position der Zelllinie kein Zelltod auf. Diese Zelltodposition ist normalerweise nur in den Zelllinien ABara und ABarp des Wildtyps zu finden. Das Auftreten des Zelltodes an dieser Position ist durch eine Schicksalstransformation von ABalp zu ABarp zu erklären, was durch ein Ausbleiben der links-rechts Induktion ausgehend von MS begründet sein kann. Allerdings kam es auch in diesen beiden Embryonen nicht zu einer kompletten Schicksalstransformation, da in dem hinteren Teil der ABalp Zelllinie nicht wie in der ABarp Zelllinie Hypodermiszellen zu finden sind. Für hybride Schicksale spricht auch, dass in einem dieser Embryonen einer der beiden Zelltode gefunden wurde, der auch im Wildtyp an dieser Position der ABalp Zelllinie präsent ist (Abbildung 5).

Das hybride Schicksal aus ABalp und ABarp in der ABalp Blastomere kann wiederum durch die schon angesprochene partielle Induktion erklärt werden. Die ABalp Blastomere empfängt im 12 Zell Stadium ein vermindertes Signal und führt deshalb ein gemischtes Schicksal aus ihrem eigentlichen ABalp Schicksal und dem Grundschicksal ABarp aus.



Temperaturabhängigkeit des Phänotyps

15

Der Phänotyp zeigt noch stärkere Defekte, wenn die Mutation bei 25°C hemizygot (in trans zu der Defizienz sDf121) vorliegt. Bei der homozygoten Mutante (25°C) sind zum Beispiel noch Basalmembranen (Pfeile in Abbildung 6) zu erkennen, in der hemizygoten Mutante sind diese nicht mehr so deutlich.

Der Temperatureinfluss und der Einfluss der Kopienanzahl des Allels (hemizygote Mutante) zeigen, dass das mutierte Protein noch eine Restfunktion besitzt. Das Allel *t1530* ist also ein hypomorphes Allel.

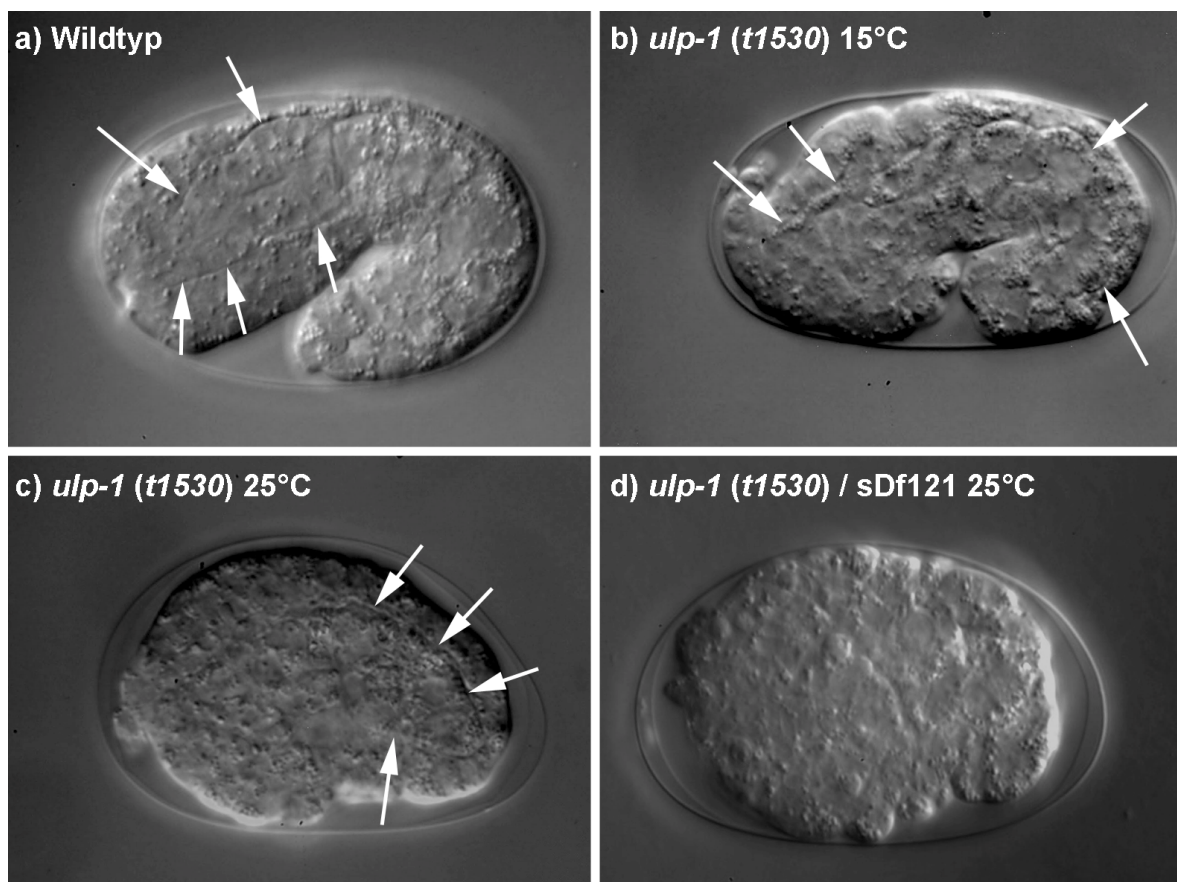


Abbildung 6: Vergleich der terminalen Phänotypen. **a)** Wildtyp Embryo im 1,5fach Stadium. Der Embryo hat in diesem Stadium mit der Elongation begonnen. **b)** homozygoter *ulp-1 (t1530)* Embryo nach Inkubation bei 15°C. Der Embryo ist ebenfalls leicht elongiert. **c)** Embryo des gleichen Genotyps aufgenommen bei 25°C. Bei dieser Temperatur kommt es nicht zur Elongation. **d)** hemizygote Mutante (*ulp-1 (t1530) / sDf121*) aufgenommen bei 25°C. Alle Embryonen befinden sich in etwa in demselben Stadium der Entwicklung (1,5fach im Wildtyp). Die Pfeile deuten auf die Basalmembranen, die in der hemizygoten Mutante nicht mehr zu erkennen sind.

Apoptotische Zellen in der *ulp-1 (t1530)* Mutante

Bei den genaueren Analysen der *ulp-1 (t1530)* Mutante mit der 4D-Mikroskopie konnte ich einen weiteren Defekt beim programmierten Zelltod beobachten, der zuvor nicht aufgefallen war. Die Zellen sterben, werden jedoch nicht phagozytiert. Im Folgenden wird der theoretische Hintergrund kurz zusammengefasst, um das Phänomen besser zu verstehen.

Theoretischer Hintergrund

Apoptose in *C.elegans*

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein wichtiger Entwicklungsprozess in verschiedenen Organismen. Es ist in den meisten Organismen essentiell, dass Zellen während der Entwicklung sterben. Die Apoptose ist auch in adulten Organismen notwendig, z.B. bei der Eliminierung von Virus infizierten Zellen. Sowohl der Signalweg, der zum Zelltod führt, als auch der Signalweg, der die Zellreste der apoptotischen Zellen beseitigt („cell engulfment“ oder „cell clearance“) ist in verschiedenen Organismen hoch konserviert.

Caenorhabditis elegans stellt ein führendes System dar, um Apoptose bzw. die Phagozytose der Zellreste zu untersuchen. Viele grundlegende Arbeiten wurden an diesem Organismus durchgeführt und dann in anderen Systemen bestätigt. Während der Entwicklung des Wurms sterben 131 Zellen der 1090 entstehenden Zellen. Diese Zellen sind durch die Zelllinie eindeutig definiert und in jedem Wurm an der gleichen Position im Zellstammbaum zu finden.

Das genetische Programm, das bestimmte Zellen in die Apoptose treibt, ist relativ gut erforscht. H. Robert Horvitz und Mitarbeiter gelten als Pioniere bei der Aufklärung des genetischen Apoptose Programmes. Sie führten eine Mutagenese mit *C.elegans* durch, um Gene zu identifizieren, die alle 131 somatischen Zelltode regulieren (Ellis und Horvitz, 1986).

In *C.elegans* werden zunächst Zellen spezifiziert den programmierten Zelltod einzugehen. Für diesen Prozess sind in bestimmten Zellen verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. *ces-1*, *ces-2* oder *tra-1*) wichtig. Diese Gene regulieren die Aktivität des für alle apoptotischen Zellen gleichen Signalweges.

egl-1, ein „BH3-only“ Protein, inhibiert die Funktion von *ced-9*, einem Homolog des menschlichen Proto-Onkogens *BCL-2* (Conradt und Horvitz, 1998). Die Funktion des Gens *ced-4*, einem Apaf-1 Homolog, wird durch *ced-9* negativ reguliert. *ced-4* aktiviert die Caspase *ced-3* (Yuan *et al.*, 1993). Das Protein *ced-3* war die erste identifizierte Caspase, für die gezeigt wurde, dass es eine Funktion im programmierten Zelltod hat. Diese Entdeckung führte zur Identifizierung anderer an der Apoptose beteiligten Caspasen in Säugetieren und anderen Organismen. Die von *ced-3* regulierten Prozesse sind vielfältig und beinhalten zum Beispiel die Degradation der DNA, die Kondensierung des Chromatins und die Regulation der Mobilität der Membranen („membrane-blebbing“) (Eldadah und Faden, 2000).

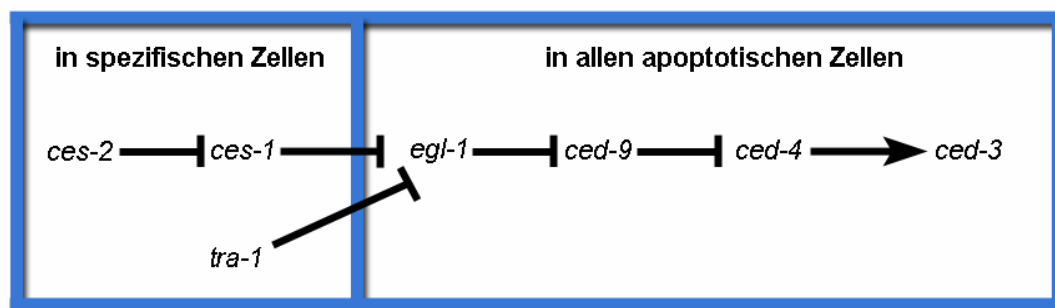


Abbildung 7: Der Apoptosesignalweg in *C.elegans*. Die Gene *ces-2*, *ces-1* und *tra-1* sind in spezifischen Zellen wichtig für die Entscheidung, ob eine Zelle stirbt. Der weitere Signalweg verläuft in allen apoptotischen Zellen gleich (verändert nach Conradt und Horvitz, 1998).

Phagozytose der apoptotischen Zellreste

Dem programmierten Zelltod folgt die Phagozytose, die Beseitigung der Zellleichen („Cell Engulfment“ oder „programmed cell clearance“). Auch dieser Prozess ist in vielen Organismen konserviert. In *C.elegans* gibt es keine Makrophagen wie in anderen Organismen. Wie in unserem Labor gezeigt werden konnte, können sich die Zellen, die im Embryo von *C.elegans* die Zellreste der apoptotischen Zellen phagozytieren, von Embryo zu Embryo unterscheiden (Hoeppner *et al.*, 2001). Bisher sind sieben Gene bekannt, die an der Beseitigung der Zellreste beteiligt sind. Durch genetische Studien wurden diese Gene bisher in zwei redundante Signalwege eingeteilt. Der eine beinhaltet die Gene *ced-1*, *ced-6* und *ced-7*, der andere die Gene *ced-2*, *ced-5*, *ced-12* und *ced-10* (Reddien und Horvitz, 2004). Durch ein neues Allel in dem Gen *ced-10*, das in dem Labor von

R. Schnabel isoliert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass beide Signalwege in *ced-10* münden (Kinchen *et al.*, 2005).

Die genaue Funktion des ABC-Transporters CED-7 in dem Engulfment-Prozess konnte bisher nicht abschließend aufgeklärt werden (Wu und Horvitz, 1998). Ein aktuelles Modell besagt, dass CED-7 auf beiden Zellen, der sterbenden und der phagozytierenden Zelle, benötigt wird um die Freisetzung bzw. Aufteilung von Phosphatidylserin (PS) an den Zelloberflächen zu regulieren (Hamon *et al.*, 2002). CED-1 ist ein Transmembranprotein, das in der phagozytierenden Zelle eine Funktion besitzt und eventuell als Rezeptor für sterbende Zellen dient (Zhou *et al.*, 2001). Das Adaptorprotein CED-6 könnte das von CED-1 aufgenommene Signal weiterleiten (Su *et al.*, 2002).

Die Proteine CED-2 (CrkII), CED-5 (DOCK180) und CED-12 (ELMO) agieren wahrscheinlich in der phagozytierenden Zelle und bilden einen ternären Komplex (Gumienny *et al.*, 2001; Reddien und Horvitz, 2000). Die homologen, humanen Proteine sind ebenfalls an dem Engulfment ähnlichen Prozessen beteiligt. Für diesen Signalweg war bisher nicht bekannt, welcher Rezeptor hier eine Funktion besitzt (Reddien und Horvitz, 2004). Durch genaue Analysen von verschiedenen Mutanten aus dem Wnt-Signalweg konnte J.Cabello in unserem Labor zeigen, dass der *C.elegans* Wnt-Rezeptor *mom-5* die oben beschriebenen Proteine reguliert (Cabello *et al.*, in preparation).

Apoptose in der *ulp-1 (t1530)* Mutante

ulp-1 Embryonen weisen Defekte während der Apoptose auf. Ein Teil der Zelltode in den *ulp-1 (t1530)* Embryonen (19,7%) wird nicht phagozytiert. Die noch phagozytierten werden im Vergleich zur Degradation im Wildtyp verlangsamt abgebaut (Tabelle 2 und Abbildung 8).

Tabelle 2: Vergleich der Phagozytose in Wildtyp, homozygote *ulp-1 (t1530)* Mutante und hemizygoten Mutante (*ulp-1 (t1530) / sDf121*). Aufgeführt sind die nicht phagozytierten Zellen (Nicht "engulfed"), die nach der Phagozytose nicht degradierten Zellen, sowie die entsprechenden Durchschnittszeiten mit Standardabweichung. "Engulfment" entspricht der Zeit von den ersten Anzeichen des Sterbens einer Zelle bis zur Phagozytose, Degradation von der Phagozytose bis zu dem Zeitpunkt, wo keine Zellreste in der phagozytierenden Zelle mehr zu erkennen sind. Zellen bei denen die betrachteten Prozesse nicht eindeutig zu erkennen sind, gehen nicht in die Berechnung ein. Ein Teil der Wildtypdaten wurde freundlicherweise von R. Schnabel zur Verfügung gestellt. (Bei Berechnung mit dem paired t-Test liegt die Signifikanz in allen Fällen bei $P < 0,001$)

Wildtyp

	Nicht "engulfed"	nicht degradiert	Anzahl
Anzahl	1	0	54
Prozent (%)	1,9	0	
	Engulfment	Degradation	
Durchschnitt (min)	15,3 ($\pm 22,2$)	28,9 ($\pm 24,1$)	
Anzahl	51	49	

ulp-1(t1530)

	Nicht "engulfed"	nicht degradiert	Anzahl
Anzahl	13	2	66
Prozent (%)	19,7	3,0	
	Engulfment	Degradation	
Durchschnitt (min)	81,9 ($\pm 93,1$)	66,2 ($\pm 39,0$)	
Anzahl	57	43	

ulp-1 (t1530)/sDf121

	Nicht "engulfed"	nicht degradiert	Anzahl
Anzahl	6	2	21
Prozent (%)	28,6	9,5	
	Engulfment	Degradation	
Durchschnitt (min)	106,8 ($\pm 98,6$)	79,0 ($\pm 37,3$)	
Anzahl	20	12	

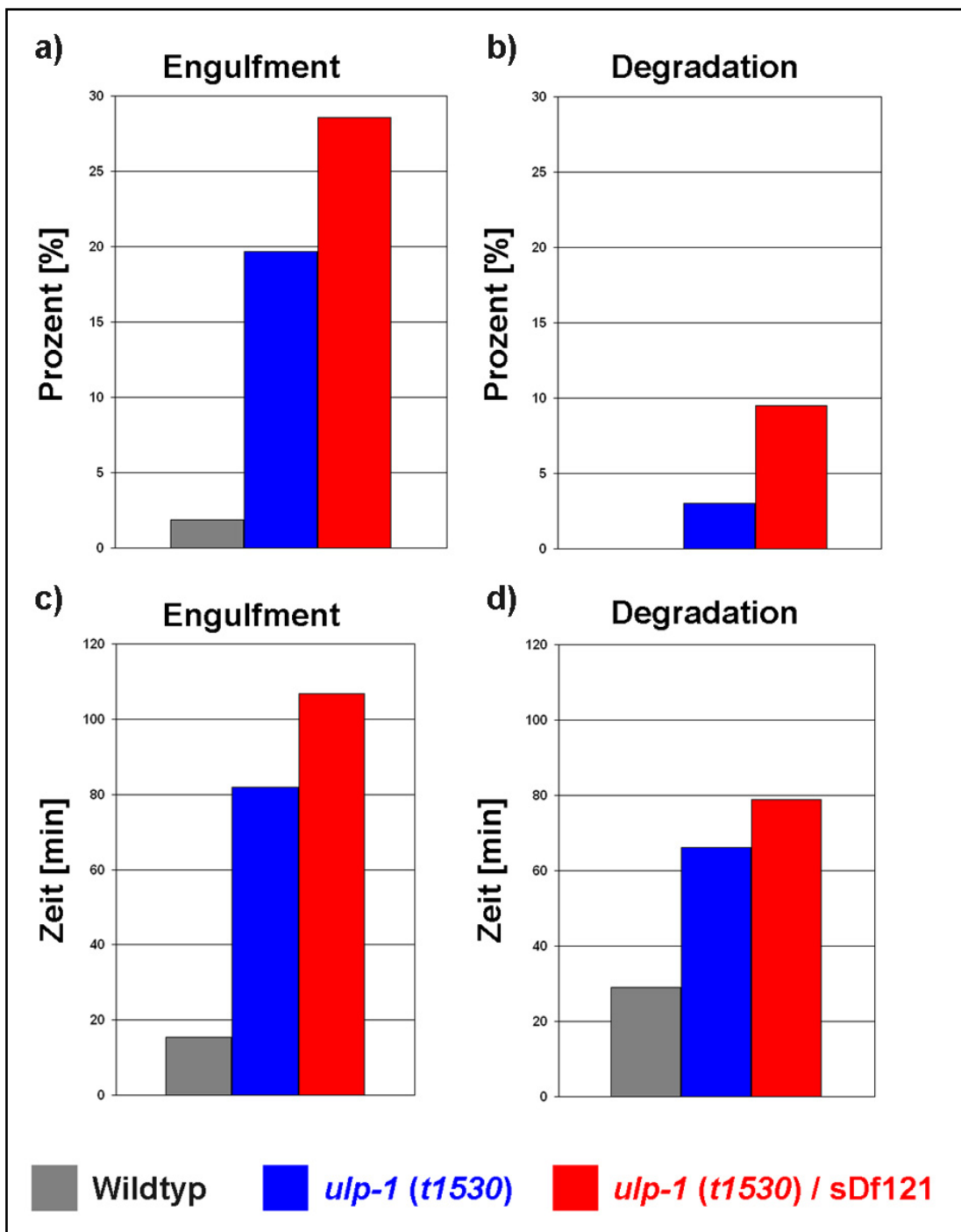


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Phagozytose- bzw. Degradationsdefekte. **a)** Prozentualer Anteil der nicht phagozytierten Zelltode. **b)** Prozent der nicht komplett degradierten Zellreste. **c)** Vergleich der durchschnittlichen Zeiten vom Sterben der Zellen bis zur Phagozytose. **d)** Durchschnittliche Zeit von der Phagozytose bis zur Degradation der Zellreste. Die Legende ist unten angegeben. Der Wildtypwert in **b)** beträgt 0%. Die Werte sind in der Tabelle 2 angegeben.

Von 66 analysierten frühen Zelltoden wurden 13 (19,7 %) in den *ulp-1 (t1530)* Embryonen bis zum Ende der jeweiligen Aufnahme nicht phagozytiert. In vier analysierten Wildtyp Embryonen (54 Zelltode) wurde nur ein Zelltod (1,9 %) nicht phagozytiert. In den hemizygoten Mutanten, in denen sich das Allel *t1530* in trans zu einer Defizienz (*sDf121*) befindet, verstärkt sich der Phagozytosedefekt auf 28,6 % (6 von 21 Zelltoden). Die durchschnittliche Zeit, die in der *ulp-1 (t1530)* Mutante von den ersten Anzeichen des Zelltodes bis zur Phagozytose vergeht, ist im Vergleich mit dem Wildtyp erhöht.

Zusätzlich zu dem Phagozytosedefekt ist in der Mutante ein Defekt in der Degradation der Zellreste in der phagozytierenden Zelle erkennbar. Im Wildtyp wird der aufgenommene Zellrest im Durchschnitt innerhalb von ca. 30 min soweit degradiert, dass dieser nicht mehr erkennbar ist. In der Mutante verläuft dieser Prozess verlangsamt. In zwei Fällen konnten die Zellreste bis zum Ende der jeweiligen Aufnahme verfolgt werden. Auch dieser Defekt in der Degradation ist in der hemizygoten Mutante stärker.

Der in dieser Mutante auftretende Defekt der Phagozytose ist in den verschiedenen Mutanten des Engulfment-Signalweges bekannt. Allerdings ist für keine dieser Mutanten beschrieben, dass diese zusätzlich eine verlangsamte Degradation der phagozytierten Zellen zeigen (alle bekannten Mutanten phagozytieren einen Teil der auftretenden Zelltode).

Der Vergleich der homozygoten mit der hemizygoten Mutante in diesen Defekten verdeutlicht wiederum, dass das Allel *t1530* kein Nullallel darstellt. Das entstehende mutierte Protein besitzt eine gewisse Restfunktion, die durch halbieren der Gendosis weiter reduziert werden kann. Dieses bestätigt erneut, dass das *t1530* Allel ein hypomorphes Allel ist.

Morphologie der apoptotischen Zellen

Das Sterben der Zellen wurde in fünf verschiedene Phasen eingeteilt: Asymmetrische Zellteilung, Ring Stadium ("ring stage"), Erythrozyten Stadium, Linsen Stadium ("lentil stage") und Phagozytose (Hoepfner *et al.*, 2001). Die einzelnen Stadien sind nicht in allen Zellstadien eindeutig zu erkennen, da einzelne morphologische Veränderungen im Embryo von *C.elegans* relativ schnell aufeinander folgen.

Für Zellstadien, wie sie im Wildtyp auftreten, ist ein Beispiel in Abbildung 9 **a)** bis **d)** gezeigt (Zellstadium #11, ABplpppapp). Die Zelle weist 24 Minuten nach der Zellteilung erste morphologische Anzeichen eines Zellstodes auf (**a**). In dem vergrößerten Ausschnitt erkennt man eine Abgrenzung der Zelle von den sie umgebenden Zellen. Diese erste sichtbare morphologische Veränderung wird als Beginn des Sterbens gewertet. Dieser Zellstadium weist das typische Linsen Stadium nach 37 Minuten auf (**b**) und wird 1 Minute später phagozytiert (**c**). Die Zellreste in der phagozytierenden Zelle können dann im Durchschnitt bis 50 Minuten nach der Zellteilung verfolgt werden.

In den Bildern **e)** bis **h)** ist der Zellstadium #9 (ABplpppapp) eines homozygoten *ulp-1 (t1530)* Embryos dargestellt. Dieser Zellstadium zeigt die ersten Anzeichen des Sterbens 28 Minuten nach der Zellteilung. Die Zelle erreicht das Linsen Stadium bis zur Phagozytose nicht (**f**) Zellstadium 3 Minuten vor der Phagozytose, **g**) Phagozytose 61 Minuten nach der Zellteilung). Der Zellrest ist auch 100 Minuten nach der Zellteilung noch deutlich zu erkennen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass einige Zellstadien in der Mutante phagozytiert werden, bevor sie das Linsen Stadium erreichen und dass die Degradation verlangsamt verläuft.

Als Beispiel für eine hemizygoten Mutante (Bilder **i)** bis **l**); *ulp-1 (t1530) / sDf121*) wird der Zellstadium #9 (ABplpppapp) gezeigt, der nur die frühen morphologischen Charakteristika aufweist und bis zum Ende der Aufnahme nicht phagozytiert wird. Der Zellstadium grenzt sich von den anderen Zellen 51 Minuten nach der Zellteilung ab (**i**) und erreicht das Linsen Stadium während der Aufnahme nicht (Ende siehe **l**) 336 Minuten nach der Zellteilung).

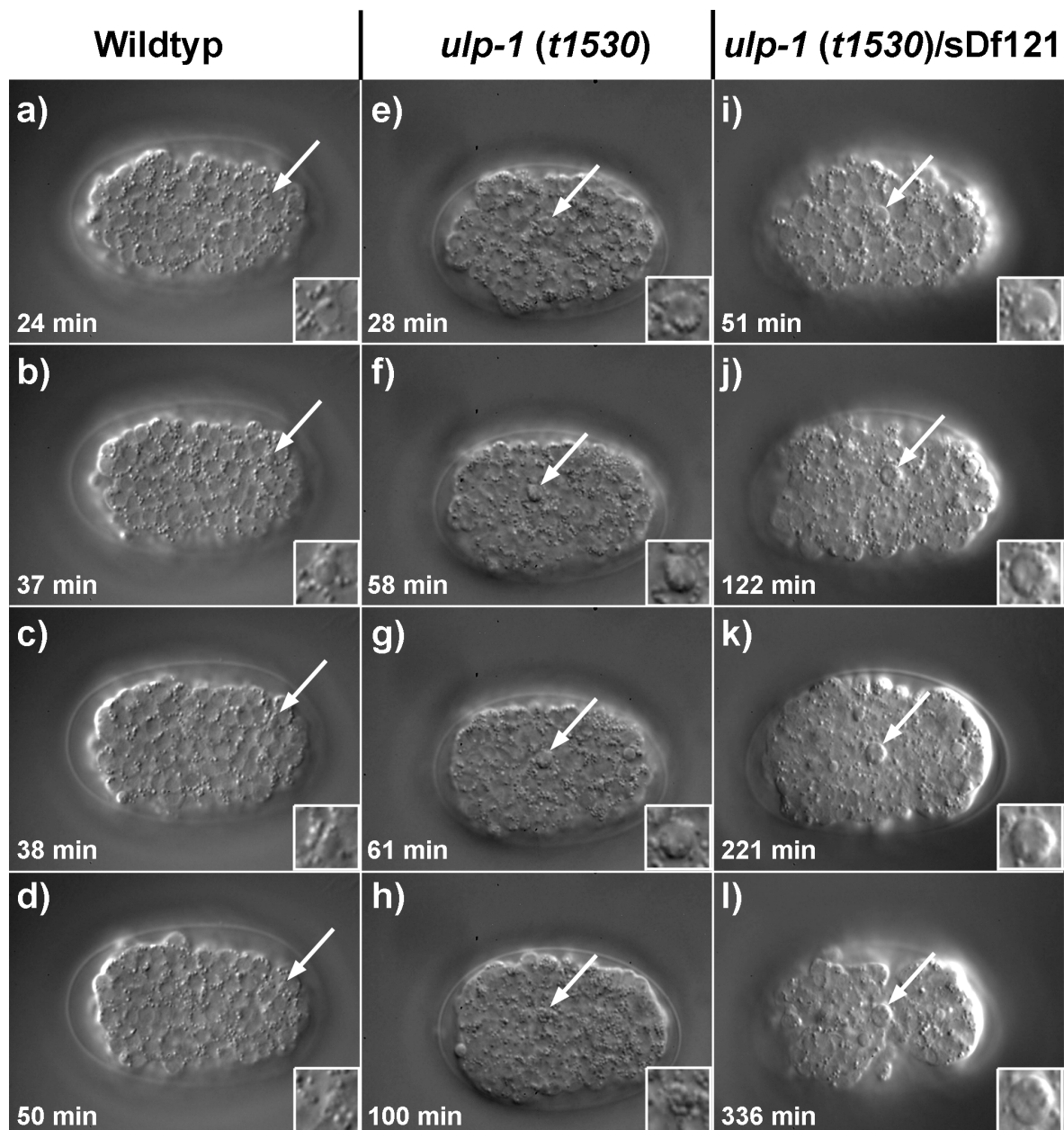


Abbildung 9: Morphologische Unterschiede in den apoptotischen Zellen des Wildtyps, der homozygoten und der hemizygoten Mutante. **a) - d)** Wildtyp. **e) - h)** homozygote *ulp-1 (t1530)* Mutante. **i) - l)** hemizygoten Mutante (*ulp-1 (t1530) / sDf121*). Der Pfeil markiert jeweils den betrachteten Zelltod, der in der vergrößerten Darstellung genauer zu erkennen ist. Als Zeitpunkt 0 min. wurde jeweils die Zellteilung gesetzt, aus der der Zelltod hervorgeht. Erklärungen siehe Text.

Der beschriebene Defekt der Phagozytose der apoptotischen Zellen vor dem Erreichen des Linsen Stadiums wurde bisher nur für schwache Allele (*op149*) der Caspase (*ced-3*) beschrieben (Hoeppner *et al.*, 2001). Ein Vergleich mit apoptotischen Zellen des Wildtyps zeigt eine weitere Auffälligkeit bei einem Teil der analysierten Zellode der *ulp-1* (*t1530*) Embryonen. Die Zellen sind vergrößert. Die vergrößerten Bildausschnitte der Zellode in der Abbildung 9 sind alle maßstabsgetreu dargestellt, so dass die Größe der Zellen gut zu vergleichen ist. Die Zellode der homozygoten und der hemizygoten Mutante sind größer als der Zelltod des Wildtyps. Des Weiteren sind in den Zelltoden der Mutante mehr granuläre Strukturen zu erkennen.

Die Morphologischen Unterschiede sowie die Defekte in der Phagozytose und der Degradation in den apoptotischen Zellen der Mutante sind bisher für keine der bekannten Mutanten des Zelltod- oder des Engulfment-Signalweges beschrieben worden.

Eine Komplizierung der beobachteten Defekte bei den Zelltoden stellt die Tatsache dar, dass die Mutante *ulp-1* (*t1530*) neben den Defekten in den apoptotischen Zellen auch Defekte in der Spezifikation von frühen Blastomeren hat. Die Defekte in den apoptotischen Zellen könnten auch ein Effekt der partiellen Induktionen sein, wenn diese nur in den Nachkommen der von den partiellen Schicksalstransformationen betroffenen Blastomeren auftreten würden. Da auch Zellode, deren Schicksal nicht von Induktionen ausgehend von MS abhängig ist, in den analysierten Embryonen auftreten, kann dieser Aspekt vernachlässigt werden.

Das Gen *ulp-1* kodiert für eine Protease

Die interessanten Phänomene rechtfertigen durch eine Klonierung eine molekulare Analyse des Gens zu initiieren.

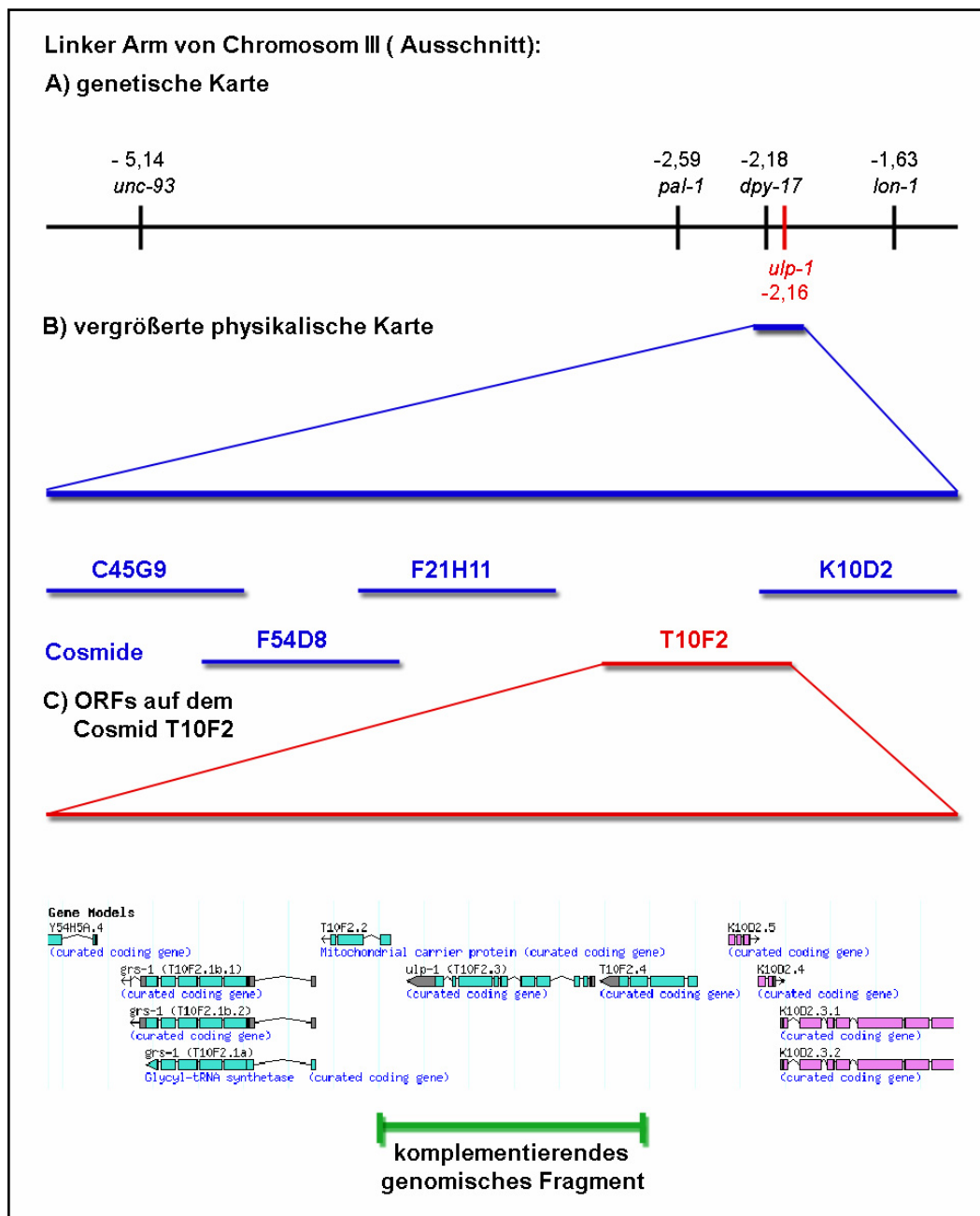


Abbildung 10: **A)** Ausschnitt vom linken Arm des Chromosoms III. Die Mutante konnte zuerst mittels klassischen genetischen Kreuzungen auf die eingezeichnete Position (-2,16 m.u.) lokalisiert werden. **B)** Vergrößerte physikalische Karte. Die einzelnen Cosmide sind eingezeichnet. Das Cosmid F54D8 wurde positiv für das Gen *dpy-17* getestet. In Transformationsexperimenten konnte die Mutation *ulp-1* (*t1530*) nur mit dem Cosmid T10F2 komplementiert werden. **C)** ORFs auf dem Cosmid T10F2. Die vorhergesagten Gene und deren Struktur, die das Cosmid T10F2 beinhaltet, sind dargestellt. Mit dem in grün eingezeichneten genomischen Fragment, das nur noch den ORF des Gens *ulp-1* (T10F2.3) trägt, konnte die Mutation komplementiert werden. (Teile der Abbildung aus <http://www.wormbase.org>)

Es wurden zunächst klassische genetische Kreuzungen durchgeführt um die Region, in der das mutierte Gen lokalisiert ist, genauer einzugrenzen. Durch verschiedene Rekombinationsereignisse zwischen den phänotypischen Markern *dpy-17* und *lon-1* konnte eine Position des Gens bei -2,16 m.u. (map units) festgelegt werden (Abbildung 10A).

Die Mutante wurde mit Cosmiden, die Bereiche dieser genomischen Region enthalten, transformiert. Das Cosmid T10F2 komplementierte die Mutation *ulp-1* (*t1530*) (Abbildung 10B). Dieses Cosmid enthält mindestens sechs ORFs (open reading frames), die zum Teil mit den entsprechenden 5'- und 3'-untranslatierten Regionen für weitere Transformationsexperimente eingesetzt wurden. Der ORF T10F2.3 war der einzige, der die Mutation komplementierte. Das genomische Fragment einschließlich der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche, das zur Komplementation benutzt wurde, ist in der Abbildung 10 dargestellt. Der ORF T10F2.3 enthält 10 Exons und die cDNA besteht aus 2094 Nukleotiden.

Das Allel *t1530* wurde sequenziert und eine Punktmutation in dem ORF T10F2.3 an der Position 1594 der cDNA wurde identifiziert. In der Mutante ist an dieser Position ein Thymin anstelle eines Cytosins. Diese Mutation führt in dem Genprodukt zu einem Aminosäureaustausch in der Position 532 des Proteins, wobei anstelle des Wildtyp Arginin in der Mutante ein Tryptophan translatiert wird.

Das ULP-1 Protein (697 Aminosäure) enthält zwei potentielle Kernlokalisierungssignale und am C-Terminus eine Peptidase Domäne (Pfam Bezeichnung: Peptidase_C48 oder Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain; *Accession number*: PF02902). Das Protein ULP-1 ist homolog zu bekannten Proteinen aus vielen verschiedenen Organismen, so z.B. *Schizosaccharomyces pombe* oder auch dem Menschen, wobei der N-Terminus der einzelnen Proteine unterschiedlich sein kann (Abbildung 11). Die Homologie ist vor allem in der C-terminalen Peptidase/Protease Domäne ausgeprägt. Die mutierte Aminosäure in dem Allel *t1530* liegt ebenfalls in der Peptidase Domäne.



Abbildung 11: Vergleich Ubiquitin ähnlicher Proteasen aus unterschiedlichen Organismen. Es sind die Proteine ULP-1 (*C.elegans*; Accession Q09353), Ulp1 (*S.pombe*; Accession O42957), SENP1 (Mus musculus; Accession P59110) und das humane SENP1 (Accession NP_055369) mit dem Programm MegAlign (DNASTar) nach der Methode ClustalW miteinander verglichen. Identische Aminosäuren sind gelb hinterlegt. Die C-terminale Peptidase Domäne ist durch den blauen Balken angedeutet. In dieser Domäne liegen auch die meisten identischen Aminosäuren in allen vier Proteinen. Die rote Pfeilspitze deutet auf die in *ulp-1* (*t1530*) mutierte Aminosäure, die in allen vier Proteinen konserviert ist. Die grünen Pfeile zeigen auf die Aminosäuren, die voraussichtlich die katalytische Triade bilden.

De-Ubiquitinierungsassay

Eine molekulare Funktion des Proteins ULP-1 wird durch Homologien mit anderen Organismen in verschiedenen Datenbanken vorhergesagt (z.B. „Protein families database of alignments and HMMs“ (Pfam), des Welcome Trust Sanger Instituts). Die ULP Proteine („ubiquitin-like protease“) haben die spezifische Funktion Ubiquitin-ähnliche Proteine von anderen Proteinen abzuspalten. Um zum einen die Proteaseaktivität nachzuweisen und zum anderen die Substratspezifität zu untersuchen, wurde ein De-Ubiquitinierungsassay durchgeführt (Kaitna *et al.*, 2002; Papa und Hochstrasser, 1993).

In dem De-Ubiquitinierungsassay wird ein potentielles Substrat als Fusion mit einem detektierbaren Protein und dem Protein ULP-1 in *E.coli* exprimiert. Die Proteinfusionen bestehen zum einen aus Ubiquitin bzw. ubiquitinähnlichen Proteinen, wie *ned-8* (Nedd8 Ortholog), *ubl-1* (ubiquitin like protein 1) und *smo-1* (SUMO Ortholog) und zum anderen aus einem verkürzten β -Gal Protein aus *E.coli*, das mittels Western-blot nachgewiesen werden kann. In den Experimenten wurden diese Fusionen in allen möglichen Kombinationen ohne einen zusätzlich exprimierenden Vektor (Negativkontrolle), einer Positivkontrolle und dem zu untersuchenden Protein Ulp-1 zusammen exprimiert. Als Positivkontrolle wurde das Deubiquitinierungsprotein DOA4 exprimiert (Papa und Hochstrasser, 1993). Nach der Anzucht der Bakterien folgte die Induktion in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden 165 Minuten nach der Induktion geerntet und ein Gesamtproteinextrakt wurde hergestellt. Mittels eines Western-blots wurde das β -Gal Protein nachgewiesen. Der spezifische Antikörper detektiert zum einen das endogene β -Gal Protein und zum anderen das Fusionsprotein. Das verkürzte β -Gal Protein wird auf dem Western-blot nur nachgewiesen, wenn Ubiquitin bzw. ein ubiquitinähnliches Protein von dem Fusionprotein abgespalten wird.

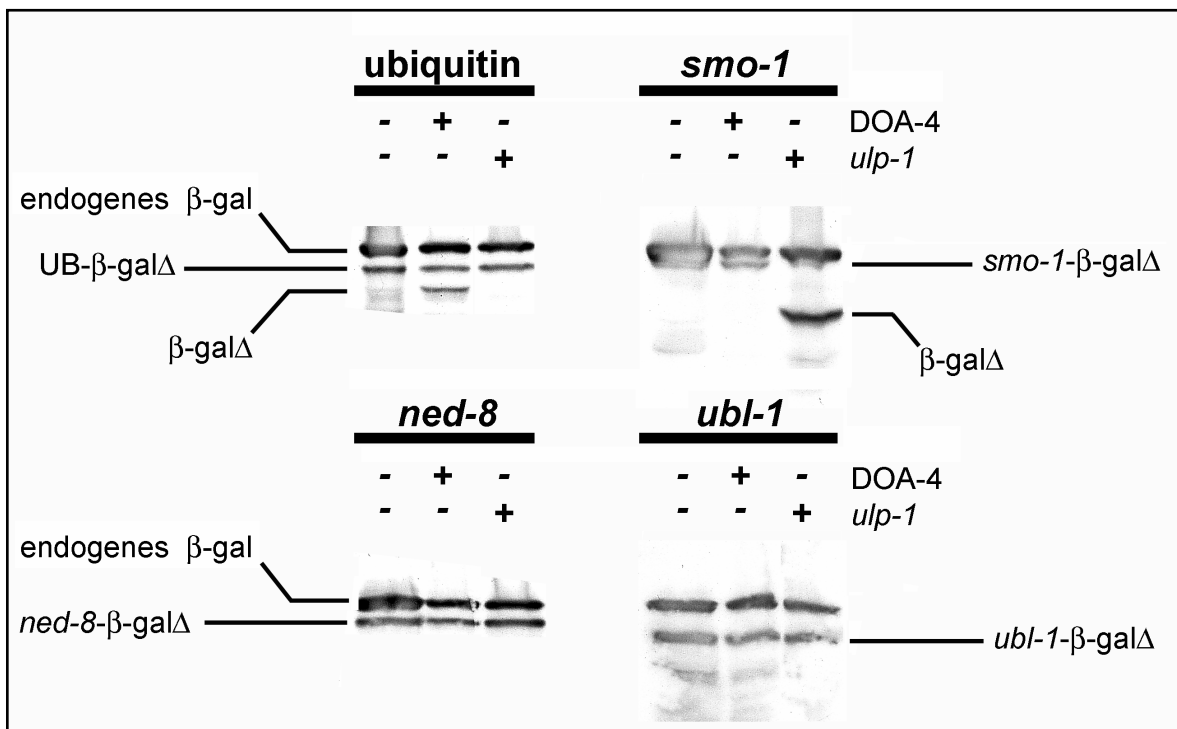


Abbildung 12: De-Ubiquitinierungsassay. Die detektierten Banden entsprechen dem endogenem β -Gal Protein, den jeweiligen Fusionsproteinen bzw. dem verkürzten β -Gal Protein. In dem ersten Ansatz wird das Fusionsprotein aus Ubiquitin und verkürzten β -Gal nur gespalten wenn zusätzlich das Hefeprotein DOA4 exprimiert wird (Positivkontrolle). Die zu untersuchende Protease ULP-1 spaltet nur das Fusionsprotein, dass das SUMO Protein enthält. Alle anderen Fusionsproteine werden sowohl von DOA4 als auch von ULP-1 nicht gespalten.

Ubiquitin wird wie erwartet nur von dem Fusionsprotein abgespalten, wenn gleichzeitig das Hefeprotein DOA4 exprimiert wird (Abbildung 12). Das DOA4 Protein ist für die Abspaltung des Ubiquitin unter diesen Bedingungen spezifisch, da die weiteren Fusionsproteine nicht gespalten werden. Das ULP-1 Protein spaltet das Fusionsprotein bestehend aus SUMO und dem verkürzten β -Gal. Die vorhergesagte Peptidase- / Proteaseaktivität wurde damit bestätigt. Des Weiteren ist diese Aktivität spezifisch für das ubiquitinähnliche Protein SUMO (*smo-1* in *C.elegans*). Alle anderen Fusionsproteine (Ubiquitin, UBL-1 und NED-8) werden nicht von ULP-1 gespalten. Das Protein ULP-1, das in der Mutante betroffen ist, hat folglich eine Funktion im SUMOylierungs-Pathway. Damit war dem Protein nicht nur über eine Homologie, sondern auch biochemisch eine Funktion

zugewiesen. Das *t1530* eine Mutation in einer SUMO spezifischen Protease ist, war zunächst überraschend, da von solch einem „generellen“ regulatorischen Protein kein so spezifischer Phänotyp zu erwarten wäre.

Theoretischer Hintergrund zum SUMO-Pathway

Das Gen *ulp-1* kodiert für eine Protease in einem posttranslationalen Modifizierungsweg, der SUMOylierung. SUMO steht für „small ubiquitin related modifier“, das, wie der Name schon sagt, dem Protein Ubiquitin ähnlich ist. SUMO besitzt nur ca. 18% Sequenzidentität mit Ubiquitin, allerdings sind die Sekundärstrukturen der beiden Proteine ähnlich (Bayer *et al.*, 1998). Die Genome von Invertebraten kodieren jeweils für ein SUMO Protein, wohingegen Vertebraten 3 bzw. 4 verschiedene SUMO Gene besitzen. In Vertebraten haben die verschiedenen SUMO Proteine (SUMO-1 bis SUMO-4) sowohl gemeinsame Substrate als auch Substrate, die nur von einem spezifischen SUMO Protein modifiziert werden.

SUMO wird wie Ubiquitin an die ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein kovalent gebunden. Der SUMO-Konjugations- und Dekonjugationsweg ist in Abbildung 13 gezeigt. Der Mechanismus zur Konjugation von SUMO an das Zielprotein ist mit der Konjugation von Ubiquitin an Zielproteine vergleichbar (siehe Hershko, 1988). Zunächst wird SUMO über einen ATP-abhängigen Prozess an das E1 aktivierende Enzym Uba2/Aos1 gebunden. SUMO wird dann auf das E2 konjugierende Enzym Ubc9 übertragen. Anschließend wird eine Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des SUMO Proteins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Akzeptorprotein katalysiert. Dieser letzte Schritt kann ein E3 ligierendes Enzym beinhalten oder aber unabhängig von diesem sein. Obwohl das E3 Enzym als Ligase bezeichnet wird, scheinen diese Proteine eher eine Adaptorfunktion einzunehmen (Gill, 2004; Johnson, 2004; Melchior *et al.*, 2003).

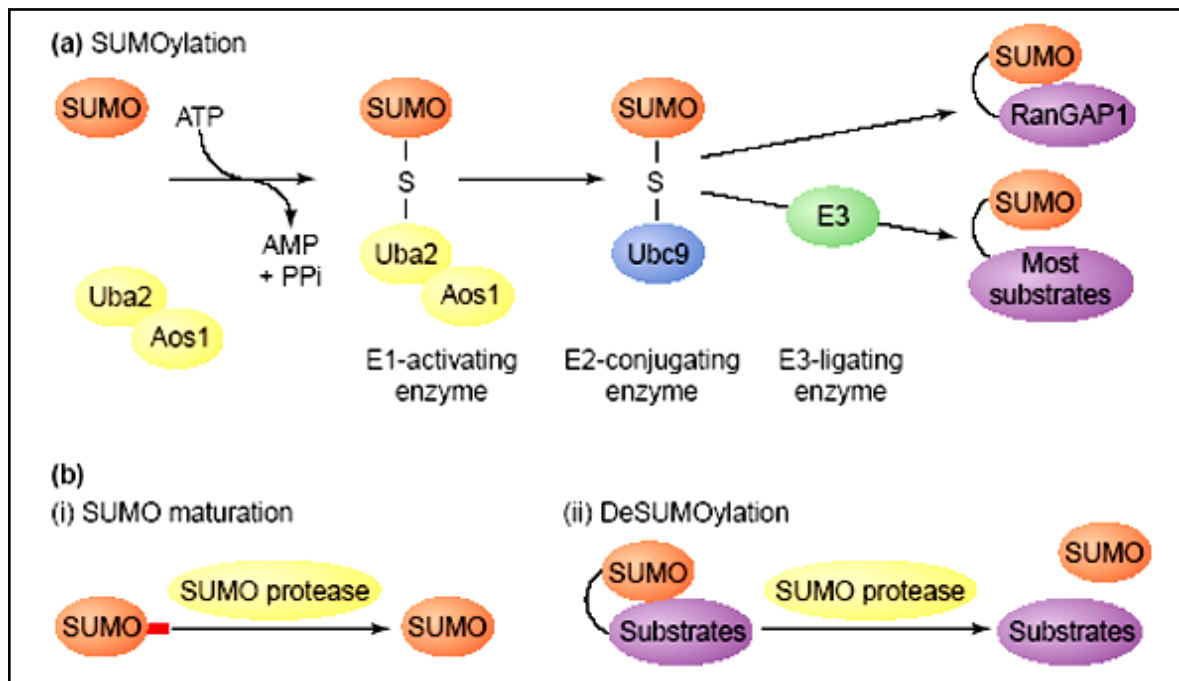


Abbildung 13: Enzyme des SUMOylierungs- und des DeSUMOylierungsweges (nach Melchior *et al.*, 2003). **(a)** Das kleine Protein SUMO wird über einen ATP-abhängigen Prozess an das E1 aktivierende Enzym Uba2/Aos1 gebunden. SUMO wird dann auf das E2 konjugierende Enzym Ubc9 übertragen. Dann wird eine Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin und der ε-Aminogruppe eines Lysins im Akzeptorprotein katalysiert. Dieser Schritt kann abhängig sein von einem E3 ligierendem Enzym. **(b)** SUMO Proteasen der Ulp1 Familie haben zwei Funktionen. **(i)** Prozessierung von SUMO. Durch proteolytische Abspaltung einer oder mehrerer Aminosäuren entsteht das typische C-terminale Glycin-Glycin Motiv, das essentiell für die Konjugation ist. **(ii)** Reversion der Modifikation. Die Peptidbindung zwischen SUMO und dem Zielprotein wird proteolytisch durch die SUMO-Proteasen gespalten. Als Produkt entstehen das unmodifizierte Akzeptorprotein und ungebundenes SUMO.

Für viele Zielproteine der SUMOylierung konnte eine minimale Konsensussequenz als SUMOylierungsstelle identifiziert werden. Diese Konsensussequenz ist vier Aminosäuren lang (Ψ KXE/D). Ψ steht für eine große aliphatische Aminosäure und X für eine beliebige Aminosäure. Obwohl die meisten bisher bekannten Zielproteine der SUMOylierung diese Konsensussequenz enthalten, gibt es auch SUMOylierungsstellen, die nicht dieser Konsensussequenz entsprechen. Als Beispiele seien PCNA in *S.cerevisiae* (Hoege *et al.*, 2002) und Smad4 (Lee *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003b) genannt.

Die SUMO spezifischen Proteasen (ULP's) haben zwei verschiedene Funktionen während der SUMOylierung, dieses ist in Abbildung 13 dargestellt. Zum einen werden die Proteasen benötigt, um das SUMO Protein in eine funktionelle Form zu bringen. SUMO wird in allen Organismen erst in einer Form translatiert in der SUMO nicht an die Zielproteine gebunden werden kann. Die SUMO spezifischen Proteasen spalten eine (im Fall von *C.elegans*) oder mehrere Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Proteins ab, um dann ein reifes SUMO Protein zu erhalten, das das charakteristische Glycin-Glycin Motiv aufweist, das essentiell für die Bindung an die Akzeptorproteine ist. Die zweite Funktion der Proteasen betrifft die Reversion der Modifizierung. Die Peptidbindung zwischen dem Zielprotein und SUMO wird gespalten, so dass wieder freies SUMO und das nicht SUMOylierte Akzeptorprotein entstehen.

Nach der Entdeckung des ersten SUMO modifizierten Proteins RanGAP1 (Matunis *et al.*, 1996) sind viele weitere Proteine identifiziert worden, die durch SUMO posttranslational modifiziert werden. Viele der bisher bekannten Zielproteine regulieren die Transkription, die Chromatin-Struktur und die DNA Reparatur. Einige der durch SUMO modifizierten Proteine haben ihre Funktion in bekannten Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel dem TGF β - oder dem Wnt-Signalweg (Kadoya *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003b; Yamamoto *et al.*, 2003).

Die Bindung von SUMO an ein Zielprotein hat andere Auswirkungen als die klassische Ubiquitinierung, obwohl die SUMOylierung analog zur Ubiquitinierung ist. Bei der klassischen Ubiquitinierung kommt es in vielen Fällen zu einer Polyubiquitinierung. Dieses dient als Signal für den Abbau des so markierten Proteins durch das Proteasom. Neuere Forschungen zeigen aber auch andere Konsequenzen der Ubiquitinierung auf. In diesen Fällen werden die Zielproteine mit nur einem Molekül Ubiquitin markiert. Diese Monoubiquitinierung markiert das Protein nicht zum Abbau durch das Proteasom, sondern es reguliert die Proteine auf verschiedene Weisen (Huang *et al.*, 2000; Schwartz und Hochstrasser, 2003).

Die SUMOylierung stellt ebenso wie die Monoubiquitinierung eine posttranslationale Modifizierung dar, die verschiedene Konsequenzen für das markierte Protein haben kann. SUMO kann die Lokalisierung, die Protein-Protein-

Interaktionen oder die Aktivität des Akzeptorproteins beeinflussen. Eine weitere Konsequenz kann der Schutz vor der ubiquitinabhängigen Degradation sein.

Eine Poly-SUMOylierung eines Substrates konnte *in vitro* (Pichler *et al.*, 2002; Tatham *et al.*, 2001) und *in vivo* in einer Hefemutante (Bylebyl *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Das Spektrum der Funktionen würde sich erweitern, wenn diese Poly-SUMOylierung im Wildtyp bestätigt wird.

Die Liste der bisher nachgewiesenen Zielproteine ist in den letzten Jahren stark angewachsen. In *C.elegans* ist bisher für drei Proteine gezeigt worden, dass sie posttranslational durch SUMO reguliert werden. Das Substrat SOP-2 ist ein „Polycomb group“ (PcG) Protein (Zhang *et al.*, 2004). Die SUMOylierung ist in diesem Fall wichtig für die Lokalisierung der SOP-2 Proteine in subnukleären Strukturen. Broday *et al.*, (2004) konnten zeigen, dass das Protein Lin-11 durch SUMO reguliert wird und die SUMOylierung für die Morphogenese der Vulva, der Gonade und des Uterus benötigt wird. Die SUMOylierung des Proteins LIN-1 inhibiert die Schicksale von bestimmten Vulvavorläuferzellen (Leight *et al.*, 2005).

Mutanten bzw. RNAi von Genen aus dem SUMO Pathway

Da die Mutante *ulp-1 (t1530)* eine Funktion im SUMO-Pathway besitzt, stellte sich die Frage, ob auch andere Mutanten bzw. Inaktivierungen von einzelnen Genen aus dem Signalweg einen vergleichbaren Phänotyp zeigen.

Das Deletionsallel *smo-1 (ok359)*

Ein Allel in *smo-1 (ok359)* wurde von dem „*C.elegans* Gene Knockout Consortium“ isoliert. In diesem Allel ist der komplette ORF, sowie 3'- und 5'-Sequenzen deletiert. Die homozygoten *smo-1* Hermaphroditen sind steril, zeigen Ausstülpungen an der Vulva und in wenigen Fällen kommt es zu einer Induktion von mehreren Vulven (Broday *et al.*, 2004; Leight *et al.*, 2005). In der Mutante kommt es zu einer maternalen Rettung der embryonalen Letalität, die durch eine posttranskriptionelle Inaktivierung (RNAi) des *smo-1* Gens nachgewiesen wurde (Fraser *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Die Mutante konnte deshalb keine Informationen über einen vergleichbaren Phänotyp oder einen Hinweis auf regulierte Proteine oder Prozesse während der Embryonalentwicklung geben.

Posttranskriptionelle Inaktivierung von *smo-1* und *ubc-9*

Mit Hilfe der Methode des RNAi (RNA mediated interference) wurden die Gene *smo-1* (SUMO) und *ubc-9* (E2 Ligase) posttranskriptionell inaktiviert. Dadurch konnte auch die maternale Funktion inaktiviert und der embryonale Phänotyp analysiert werden.

Die RNAi Experimente mit den beiden Genen *smo-1* und *ubc-9* resultierten in ähnlichen Phänotypen. Als intermediären Phänotyp ergaben sich adulte Hermaphroditen in der F1 Generation, die wie die *smo-1* (*ok359*) Deletionsmutante Sterilität und eine Ausstülpung an der Vulva aufwiesen. Die Mehrzahl der Nachkommen in der F1 Generation war embryonal letal. Von diesen wurden einige mit dem 4D-Mikroskop aufgenommen und eine Zelllinienanalyse durchgeführt. Es ließen sich, wie bei den *ulp-1* (*t1530*) Embryonen, keine eindeutigen frühen Zellschicksalstransformationen nachweisen.

Die Embryonen aus den RNAi Experimenten für *ubc-9* und *smo-1* zeigen einen „ventral closure“ Defekt (Abbildung 14). Die Hypodermis schließt sich auf der ventralen Seite des Embryos somit nicht. Kurz vor dem prämorphogenetischen Stadium treffen die Nachkommen der Zellen ABplp und ABprp normalerweise auf der ventralen Seite des Embryos aufeinander und schließen die Hypodermis-schicht auf dieser Seite.

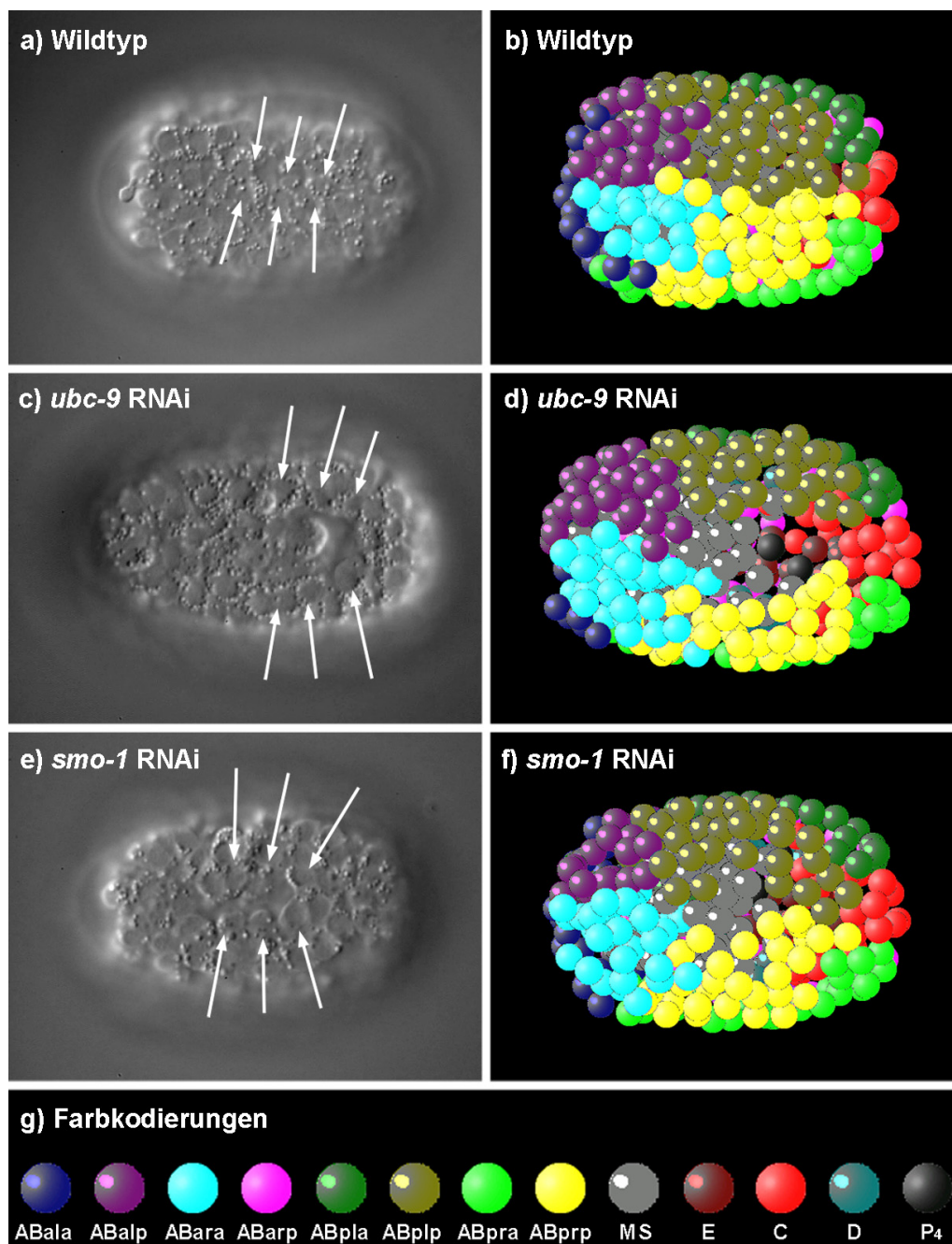


Abbildung 14: „Ventral closure“ Defekte in Embryonen der *ubc-9* und *smo-1* RNAi Experimente. **a)** und **b)** in Wildtyp Embryonen schließt sich die Hypodermis auf der ventralen Seite durch die Nachkommen der Zellen ABplp und ABprp. **c)** und **d)** in Embryonen die aus den RNAi Experimenten für das *ubc-9* Gen hervorgehen kommt es nicht zur „ventral closure“. Es kommt nicht zum Zusammenschluss der Nachkommen der Zellen ABplp und ABprp. **e)** und **f)** *smo-1* RNAi Embryonen zeigen den gleichen Defekt, allerdings ist in diesem Fall nur der anteriore Bereich betroffen. **g)** Farbkodierung für die 3D Repräsentationen. Die Pfeile in den Nomarski Bildern zeigen auf Nachkommen der ABplp und ABprp Zellen, die die „ventral closure“ im Wildtyp durchführen.

In den Embryonen aus den RNAi Experimenten für *ubc-9* und *smo-1* kommt es nicht bzw. nur teilweise zum Zusammenschluss der Hypodermis auf der ventralen Seite (Abbildung 14). Dieser Defekt konnte nicht in den *ulp-1* Embryonen beobachtet werden. Alle drei Proteine sind in dem posttranslationalen Modifikationsweg der SUMOylierung beteiligt. Die Protease ULP-1 besitzt die Funktion der DeSUMOylierung, weshalb der Phänotyp nicht identisch sein muss. Vielmehr würde man aufgrund der antagonistischen Funktion der Protease ULP-1 einen gegenteiligen Effekt in den RNAi Experimenten der Gene *ubc-9* und *smo-1* erwarten.

Die Inaktivierung der Genexpression mit RNAi ist meist nicht vollständig, so dass der Nullphänotyp nicht erwartet werden kann. Zum Beispiel ergibt eine Inaktivierung des *ulp-1* Gens mit RNAi lediglich einen postembryonalen Phänotyp, wohingegen die maternale Mutante (*t1530*) einen embryonal letalen Phänotyp zeigt. Diese unvollständige Inaktivierung muss bei allen RNAi Experimenten beachtet werden.

Apoptotische Zellen in verschiedenen RNAi Embryonen

Die Embryonen aus den RNAi Experimenten der Gene *smo-1* und *ubc-9* haben bezogen auf die apoptotischen Zellen einen Phänotyp, der von der *ulp-1* (*t1530*) Mutante bekannt ist (Abbildung 15). Apoptotische Zellen weisen wie in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante eine veränderte Morphologie auf und werden zum Teil nicht phagozytiert.

Die Zelltode in den RNAi Embryonen der Gene *ubc-9* und *smo-1* sind wie in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante größer und weisen zum Teil auch nur die frühen Charakteristika eines Zelltodes auf (Ring Stadium und Erythrozyten Stadium). Wie oben beschrieben konnte in schwachen Allelen der Caspase *ced-3* beobachtet werden, dass einzelne Zelltode phagozytiert werden bevor sie das Linsen Stadium erreicht haben (Hoepfner *et al.*, 2001). Allerdings sind sowohl in *ced-3*, als auch in anderen Mutanten des Apoptose- bzw. des Phagozytosesignalweges keine morphologischen Veränderungen beschrieben, die mit denen in der Mutante und den RNAis vergleichbar wären.

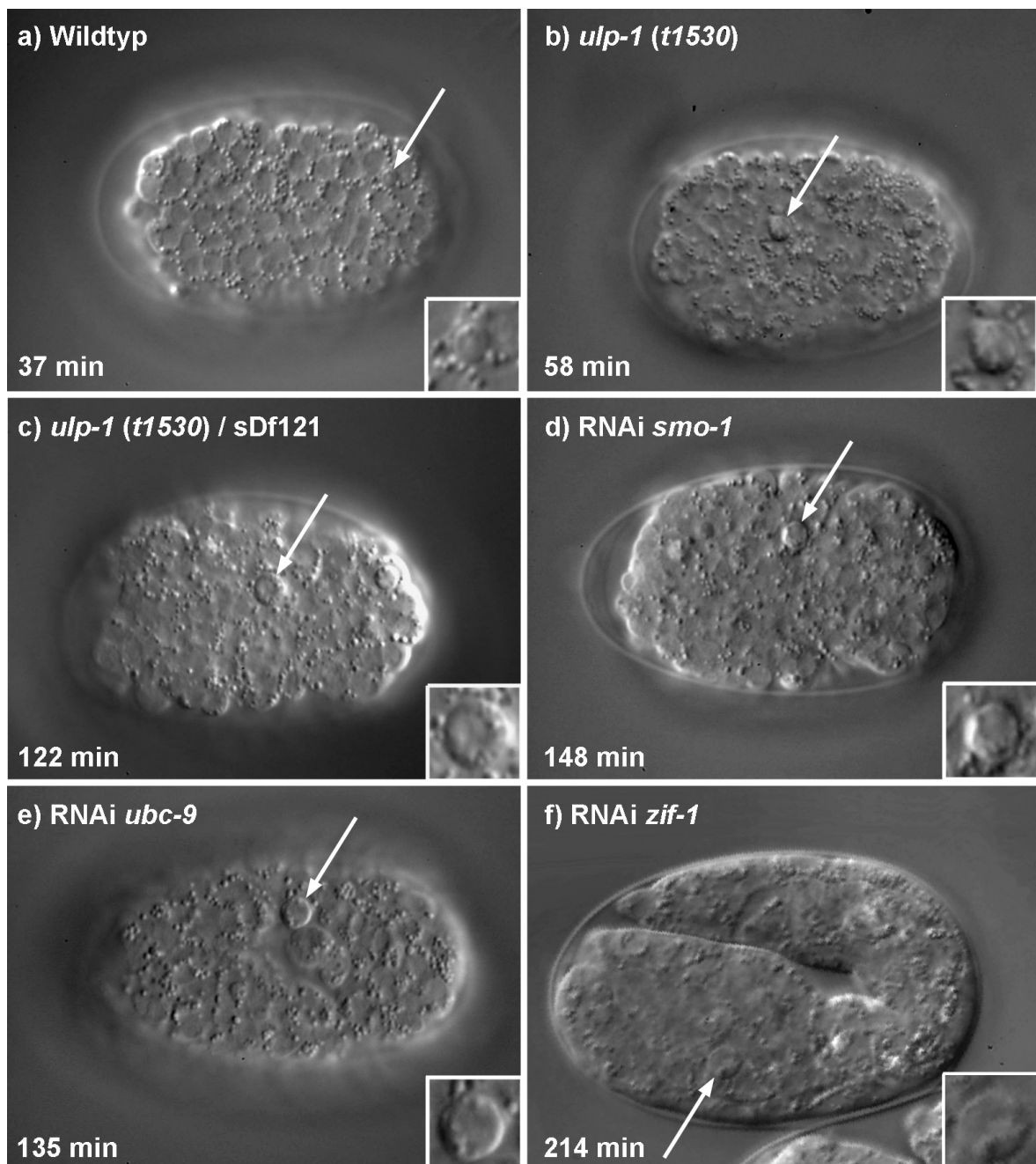


Abbildung 15: Vergleich der Morphologie der Zellteilung in der Mutante *ulp-1 (t1530)* und verschiedener RNAis. Die Pfeile deuten auf apoptotischen Zellen, die in den Vergrößerungen dargestellt sind. Die Zeit von der Zellteilung, aus der der Zelltod hervorgeht, bis zu dem dargestellten Zeitpunkt ist angegeben. **a)** Wildtyp, **b)** homozygote *ulp-1 (t1530)* Mutante, **c)** hemizygoten Mutante (*ulp-1 (t1530) / sDf121*), **d)** RNAi *smo-1*, **e)** RNAi *ubc-9*, **f)** RNAi *zif-1*. Die dargestellten Zelltode der Mutante und der RNAis erreichen nicht das Linsenstadium und sind im Vergleich zum Wildtyp größer.

Auf Umwegen, die nicht mehr wichtig sind, habe ich gezeigt, dass apoptotische Zellen von *zif-1* RNAi Embryonen eine vergleichbare Morphologie wie die apoptotischen Zellen in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante aufweisen (Abbildung 15). Einige Zelltode werden nicht phagozytiert. Die Größe der apoptotischen Zellen und das nicht auftretende Linsen Stadium in den Zelltoden der *zif-1* RNAi Embryonen ist den vorher beschriebenen Beobachtungen in den Embryonen, in denen der SUMOylierungsweg beeinträchtigt ist, ähnlich.

Die Zelltode des Wildtyps, der Mutante (*ulp-1*) und der RNAis (*smo-1*, *ubc-9* und *zif-1*) werden in der Abbildung 15 miteinander verglichen. Alle dargestellten apoptotischen Zellen der Mutante und der RNAis sind größer als typische Zelltode des Wildtyps.

Das Protein ZIF-1 ist ein SOCS-Box („suppressor of cytokines signaling“) Protein, dass mit der E3 Ubiquitin Ligase (Untereinheit Elongin C) interagiert und als eine Brücke zwischen einem Substrat und der E3 Ligase fungiert. Das ZIF-1 Protein besitzt also eine Funktion in der ubiquitinabhängigen Degradation von Proteinen.

Die Ergebnisse in den apoptotischen Zellen der verschiedenen RNAi Experimente deuten auf eine Funktion der SUMOylierung hin, die einen Prozess reguliert, an dem auch Ubiquitin beteiligt ist. Die SUMOylierung eines Proteins kann einen antagonistischen Effekt gegenüber der ubiquitinabhängigen Degradation haben, zum Beispiel durch Markierung eines Lysins, an das auch das Ubiquitin gebunden wird. Als Beispiel seien die IAP („inhibitor of apoptosis“) Proteine genannt, die verschiedene Einflüsse auf die Apoptose in Vertebraten haben. Dieser Aspekt und weitergehende Gedanken werden in der Diskussion behandelt.

Lokalisierung von ULP-1 und SMO-1

Die Phänotypen der *ulp-1* Mutante bzw. der Embryonen aus den RNAi Experimenten (*smo-1* und *ubc-9*) betreffen zum Teil spezifische Zellen (z.B. die apoptotischen Zellen). Es stellte sich die Frage, ob einzelne Proteine aus dem SUMOylierungs-Pathway zu unterschiedlichen Zeiten bzw. in unterschiedlichen Zellen oder Zelllinien exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden Expressions-

konstrukte hergestellt, die ein Fusionsprotein, bestehend aus GFP („green fluorescence protein“) und dem entsprechende Protein exprimieren.

Expression des Fusionsproteins ULP-1::GFP

Für das ULP-1 Expressionkonstrukt wurde der ORF des GFP vor das Stoppkodon des *ulp-1* Leserasters kloniert, so dass eine C-terminale Fusion des GFP an das ULP-1 translatiert wird. Die entsprechenden 3'- und 5'- Sequenzen des *ulp-1* Gens sind auch auf dem Vektor enthalten. Diese Sequenzen sind ausreichend für eine Komplementation der *ulp-1* (*t1530*) Mutante.

Sowohl die *ulp-1* (*t1530*) Mutante als auch der Wildtyp wurden mit dem Fusionskonstrukt und einem Transformationsmarker ballistisch transformiert (Wilm *et al.*, 1999). Die resultierenden stabilen Linien wurden auf die GFP-Expression untersucht und im *ulp-1* (*t1530*) Hintergrund auf die komplementierende Wirkung getestet.

Die Expressionsanalysen wurden mit einem 4D-Mikroskop durchgeführt, das mit zwei Kanälen ausgestattet ist. Dieses ermöglicht einerseits die Entwicklung des Embryos und zu gewünschten Zeitpunkten zusätzlich einen GFP Bildstapel von dem Embryo aufzunehmen, so dass die einzelnen GFP exprimierenden Zellen durch eine Zelllinienanalyse bestimmt werden können.

In den frühen Entwicklungsstadien konnte keine Expression des ULP-1::GFP Fusionsproteins detektiert werden. Die Expression kann in einzelnen Nachkommen der MS-Zelllinie nachgewiesen werden und kurze Zeit später auch in Nachkommen der C- und D-Zelllinie (Abbildung 16). Durch Zelllinienanalyse der exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um Vorläuferzellen von Hypodermis-, Körpermuskel- und Nervenzellen handelt.

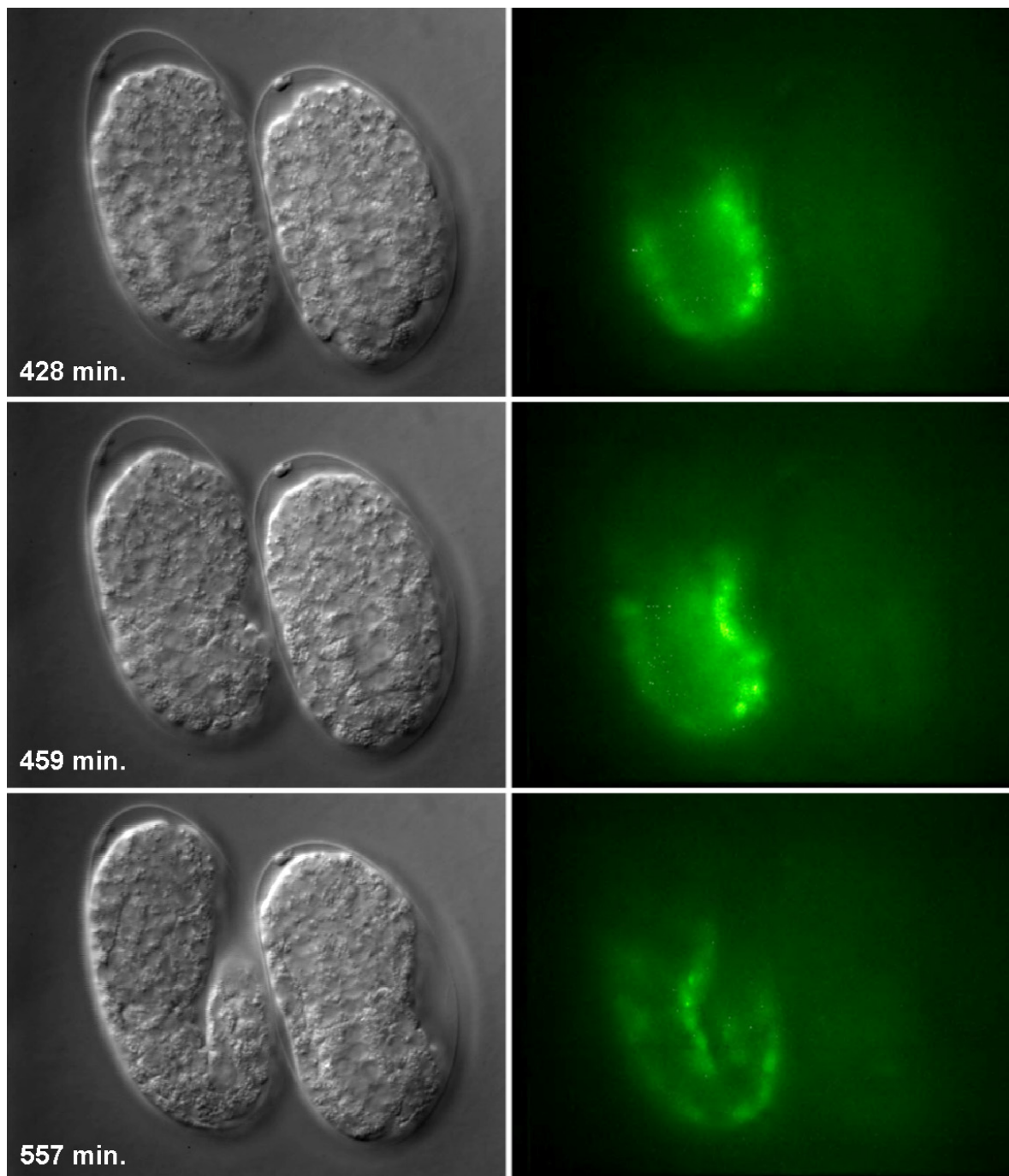


Abbildung 16: Detektierte Expression des ULP-1::GFP Fusionsproteins. Links Nomarski, rechts GFP Kanal. Die Zeit der Entwicklung ist angegeben, der Zeitpunkt 0 min. entspricht dem Beginn der Entwicklung mit der Zygote. Beide Embryonen stammen von einem Hermaphroditen mit dem Genotyp *unc-32 ulp-1 (t1530)*; pIB02 (gen. *ulp-1::GFP*), der bei 15°C inkubiert wurde. Während der linke Embryo das Fusionsprotein exprimiert und dadurch überlebt, ist in dem rechten keine Expression detektierbar.

Die Expressionsanalyse des Fusionsproteins ULP-1::GFP spricht für eine späte Funktion des Proteins während der Embryogenese. Die detektierbare Expression im Embryo ist fast ausschließlich auf Hypodermis und Körpermuskelzellen beschränkt, wobei die Anzahl an differenzierten Körpermuskelzellen auch in der Mutante erniedrigt ist (siehe Antikörperfärbungen).

Die für den Transformationsmarker positiven stabilen Linien in dem *ulp-1* (*t1530*) Hintergrund komplementierten die Mutation bei 15°C, allerdings nicht bei 25°C. Ein solcher Temperatureffekt konnte bei den stabilen Linien, die nur das entsprechende genomischen Fragment des *ulp-1* Gens (ohne das GFP) enthalten, nicht beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die Temperaturabhängigkeit der Komplementierung ist, dass die Aktivität des GFP Fusionsproteins schwächer als die des normalen Proteins ist. Wie gezeigt, hat das mutante Allel *t1530* bei 15°C einen schwächeren Phänotyp (siehe Temperaturabhängigkeit des Phänotyps). Dieses weist auf mehr intrinsische Aktivität hin, die durch das schwächere ULP-1::GFP Fusionsprotein noch komplementiert werden kann. Allerdings ist ein alternatives Szenario, dass bei 15°C die endogene maternale Aktivität noch für die frühe Funktion ausreichend ist und die spätere zygotische Funktion durch das zygotisch experimentierte ULP-1::GFP Fusionsprotein (von einem extrachromosomalen Array) komplementiert wird, was ich für wahrscheinlich halte.

In *C.elegans* ist es bisher nicht möglich, effizient Fremdgene oder gentechnisch veränderte Gene über homologe Rekombination in den Organismus einzubringen, da die hierfür benötigten Selektionsmethoden noch nicht vorhanden sind. Die bisher möglichen Transformationsmethoden führen in den meisten Fällen zu Concatemeren, die extrachromosomal vorliegen und vererbt werden. Die Concatemere bestehen aus zum Teil hunderten von Kopien der eingebrachten DNA (Stinchcomb *et al.*, 1985). Ein bekanntes Phänomen in *C.elegans* ist, dass die Keimbahnexpression von Genen, die auf diesen extrachromosomalen Arrays liegen, unterdrückt wird (Kelly *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass diese Unterdrückung durch komplexere extrachromosomale Arrays verhindert werden kann. Um ein komplexeres Array zu erhalten, wurde das GFP-Expressions-

konstrukt auf einen YAC („yeast artificial chromosome“) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* integriert.

ULP-1::GFP auf einen YAC

Das benutzte YAC (Y97D10) enthält die genomische Region des *ulp-1* Gens aus *C.elegans*. Durch die homologen Sequenzen des Expressionskonstruktes und des YACs wird das Konstrukt in der Hefe über homologe Rekombination integriert (persönliche Mitteilung H. Schmidt und R. Schnabel). Nach erfolgreicher Integration wird die genomische DNA aus der Hefe isoliert und für die ballistische Transformation des *ulp-1* (*t1530*) Stammes eingesetzt.

Aus den Transformationsexperimenten mit der *ulp-1* Mutante gingen zwei unabhängige stabile Linien hervor. Nur eine dieser Linien komplementierte bei 15°C und 25°C die *ulp-1* (*t1530*) Mutation. Dieser Stamm exprimiert bei 15°C inkubiert das Fusionsprotein nicht in der Keimbahn. Bei 25°C war erstaunlicherweise eine maternale Expression des funktionellen ULP-1::GFP Fusionsprotein (von dem generierten komplexeren Array) zu sehen. Eine Erklärung für die temperaturabhängige Keimbahnexpression des Fusionsproteins ist, dass das Fusionsprotein aufgrund des spezifischen Allels (siehe Temperaturabhängigkeit des Phänotyps) und dem daraus resultierenden Selektionsdruck bei 25°C exprimiert wird.

Die Ergebnisse machen die aufgestellte Hypothese, dass die frühe Funktion des Proteins bei 15°C eventuell noch von der endogenen, mutierten Form übernommen werden kann, wahrscheinlich. Die frühe Funktion des *ulp-1* Gens kann nur komplementiert werden, wenn das Fusionsprotein maternal exprimiert wird, wie durch die Generierung des extrachromosomalen Arrays gezeigt.

Das über den YAC eingebrachte ULP-1::GFP Fusionsprotein ist in den Keimbahnzellen der Gonade detektierbar und ist im frühen Embryo in allen Zellen lokalisiert. Sowohl die frühen Keimbahnzellen (Pfeilspitzen in Abbildung 17), als auch die reifenden Oozyten (Pfeile) enthalten das ULP-1::GFP Fusionsprotein. Das GFP-Signal ist in den reifenden Oozyten stärker als in den frühen Keimbahnzellen. Das Protein ist in allen Keimbahnzellen an der Kernhülle lokalisiert.

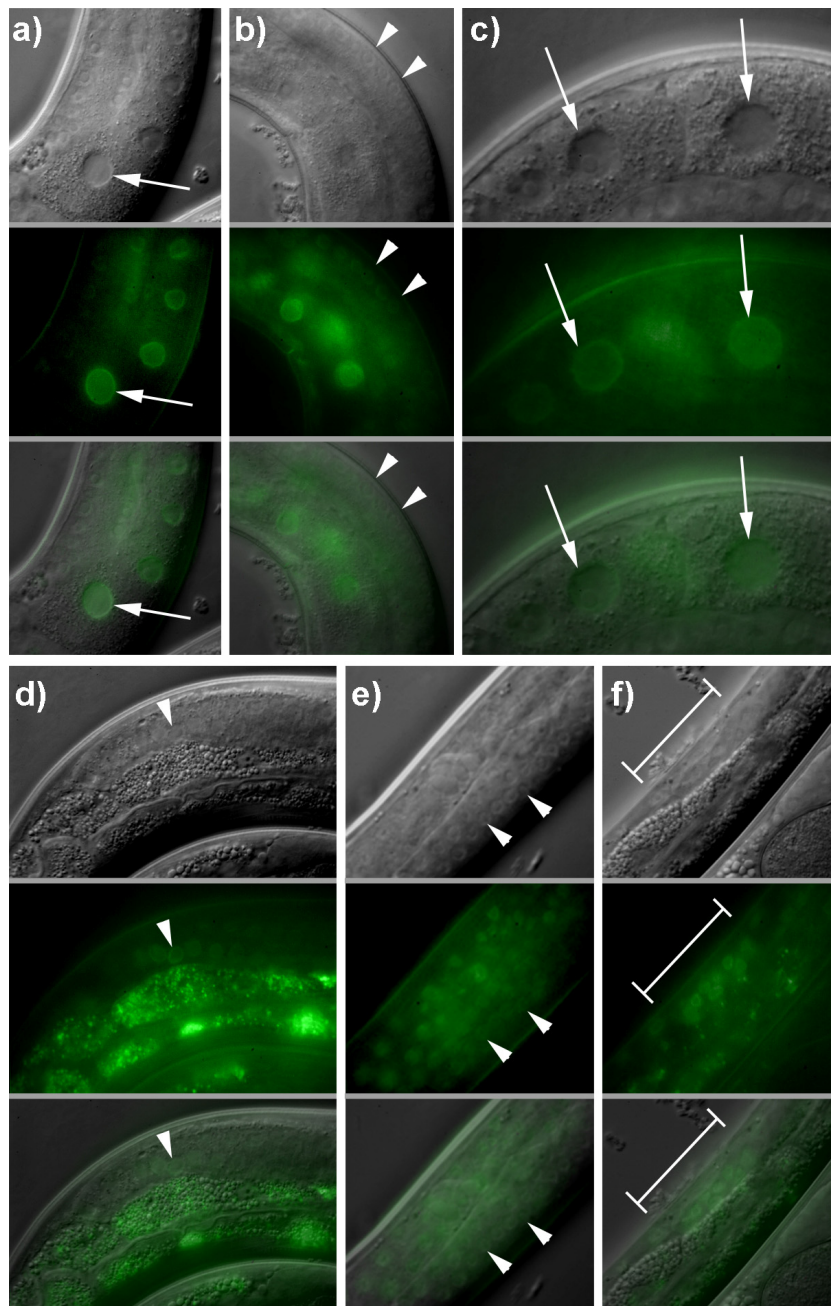


Abbildung 17: Keimbahnexpression des mit Hilfe eines YACs eingebrachten Fusionsproteins ULP-1::GFP. **a) bis d)** adulte Hermaphroditen. Das ULP-1::GFP Fusionsprotein ist an der Kernhülle der reifenden Oozyten (Pfeile) und in den frühen Keimbahnzellen (Pfeilspitzen) lokalisiert. **e)** Im L4 Larvenstadium ist das Fusionsprotein ebenfalls in den Keimbahnzellen exprimiert (Pfeilspitzen). **f)** In der sich entwickelnden Gonade von L1/L2 Larven ist das Protein in den Keimbahnzellen detektierbar (Balken deutet die noch kleine Gonade an). Die punktuelle Färbung in **d)** ist die Autofluoreszenz des Darms und stellt keine GFP Expression dar. Die dargestellten Hermaphroditen haben alle den Genotyp *unc-32 (e189) ulp-1 (t1530); ULP-1::GFP*.

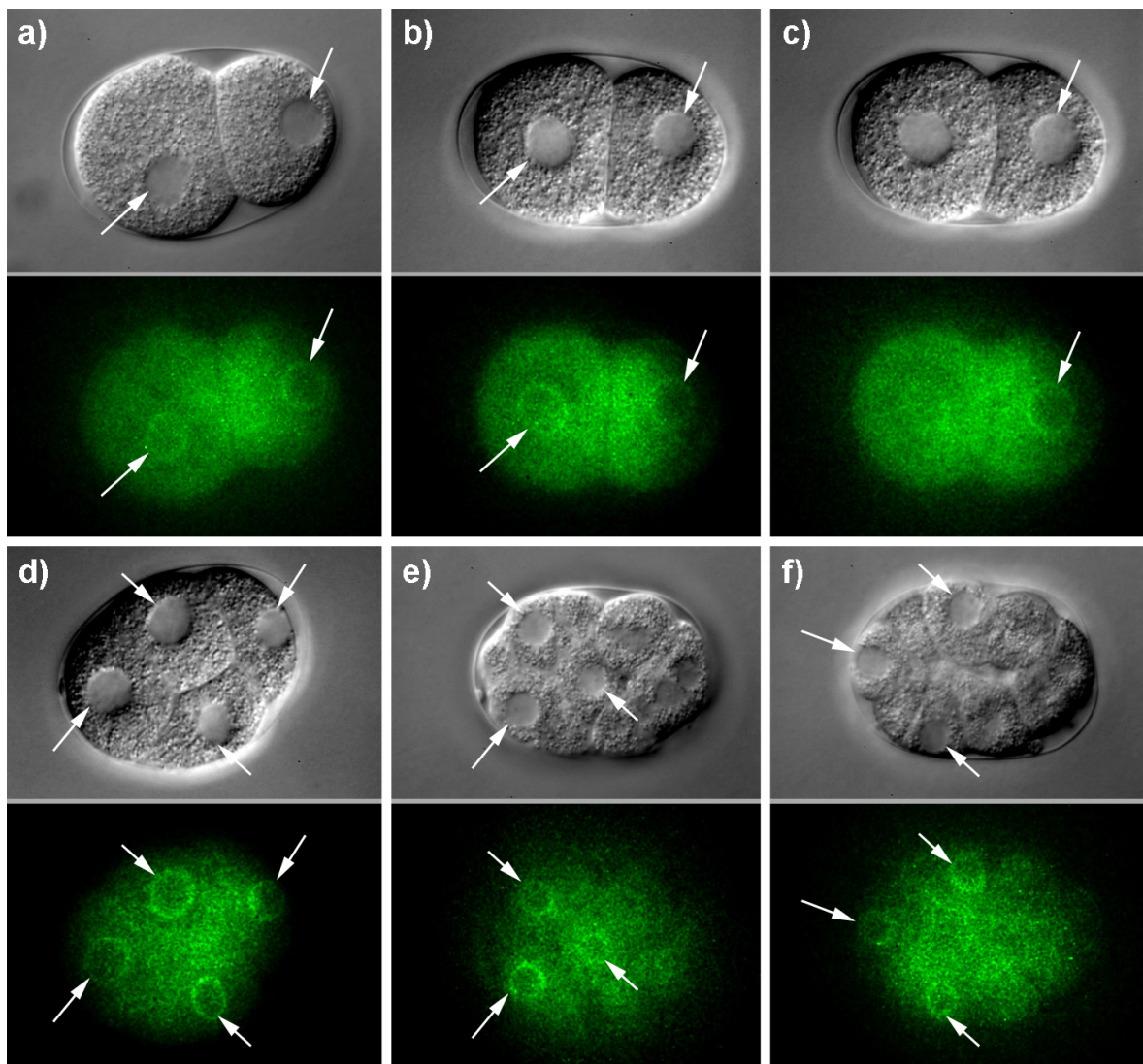


Abbildung 18: ULP-1::GFP Expression im frühen Embryo. **a)** Frühes 2-Zell Stadium. **b)** Mittleres 2-Zell Stadium. In beiden Embryonen ist das ULP-1::GFP Fusionsprotein an den Kernhüllen der beiden Blastomeren lokalisiert. **c)** Spätes 2-Zell Stadium. Die Lokalisierung des Fusionsproteins an der Kernhülle wird in der anterioren AB Blastomere, die sich kurz vor der Teilung befindet, schwächer. **d)** 4-Zell Stadium. **e)** und **f)** zwei Focuslevel eines Embryos in einem etwas späteren Stadium (14 Zellen). Die cytoplasmatische Färbung könnte ebenfalls das Fusionsprotein darstellen, allerdings weisen *C.elegans* Embryonen in diesen Stadien eine Autofluoreszenz auf, so dass die detektierte Färbung nicht abschließend beurteilt werden kann. Alle Embryonen haben den Genotyp *unc-32 (e189) ulp-1 (t1530)*; ULP-1::GFP. Die Pfeile zeigen auf die Kernhüllen, in denen das ULP-1::GFP Fusionsprotein lokalisiert ist.

Im frühen Embryo ist das Fusionsprotein in allen Blastomeren detektierbar. Es ist während der Interphase ebenfalls an der Kernhülle lokalisiert (Pfeile in Abbildung 18). In den Embryonen ist zusätzlich eine cytoplasmatische Färbung detektierbar, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies nur der Autofluoreszenz der Embryonen entspricht. Die Lokalisation des Fusionsproteins während der mitotischen Teilung kann deshalb ebenfalls nicht beurteilt werden.

Expressionsanalysen maternaler Gene in *C.elegans* sind problematisch, wie auch hier die Anwendung unterschiedlicher Strategien zur Expression des ULP-1::GFP Fusionsproteins gezeigt hat. Die späte, zygotische Expression in den Körpermuskel- und Hypodermiszellen deutet auf eine Funktion in der Embryogenese hin, die den auftretenden Phänotyp in der *ulp-1* Mutante teilweise erklären könnte. In dieser Arbeit konnte aber auch eine ganz frühe Funktion des Gens nachgewiesen werden (siehe unten). Die Methode mit Hilfe eines YACs ein komplexeres extrachromosomales Array zu generieren und so die Unterdrückung der Keimbahnexpression zu verhindern, half in diesem speziellen Fall, allerdings nur unter großem Selektionsdruck.

Die subzelluläre Lokalisierung des ULP-1 Proteins zu den Kernhüllen in den Embryonen und in den Gonaden entspricht der Lokalisierung verschiedener homologer Proteine in anderen Organismen (Hang und Dasso, 2002; Smith *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004a). Für ein humanes Homolog (Human SENP1) ist gezeigt worden, dass es gleichmäßig im Zellkern verteilt vorliegt (Gong *et al.*, 2000). Ein zweites humanes Homolog (SENP2) ist an der nucleoplasmatischen Seite der Kernporen lokalisiert (Hang und Dasso, 2002). Die Lokalisierung des untersuchten ULP-1 Proteins aus *C.elegans* gleicht also eher dem SENP2 Protein des Menschen. Es liegt keine unterschiedliche Lokalisierung des Proteins in verschiedenen Zellen des frühen Embryos vor. Anhand dieser Daten kann keine Aussage über eine Funktion in einer einzelnen Zelle getroffen werden. Das Protein ist also ubiquitär im frühen Embryo exprimiert.

Expression des Fusionsproteins GFP::SMO-1

Für das Protein SMO-1 wurde ebenfalls ein Expressionskonstrukt hergestellt, das ein Fusionsprotein mit dem GFP Protein exprimieren soll. Es wurde in diesem

Fall keine C-terminale Fusion in Betracht gezogen. Der C-terminale Teil hinter dem Glycin-Glycin Motiv wird entweder abgespalten oder das SMO-1::GFP Fusionsprotein wird nicht mehr an potentielle Zielproteine gebunden. Hierfür ist ein C-terminales Glycin-Glycin Motiv essentiell und deshalb wurde eine N-terminale Fusion hergestellt.

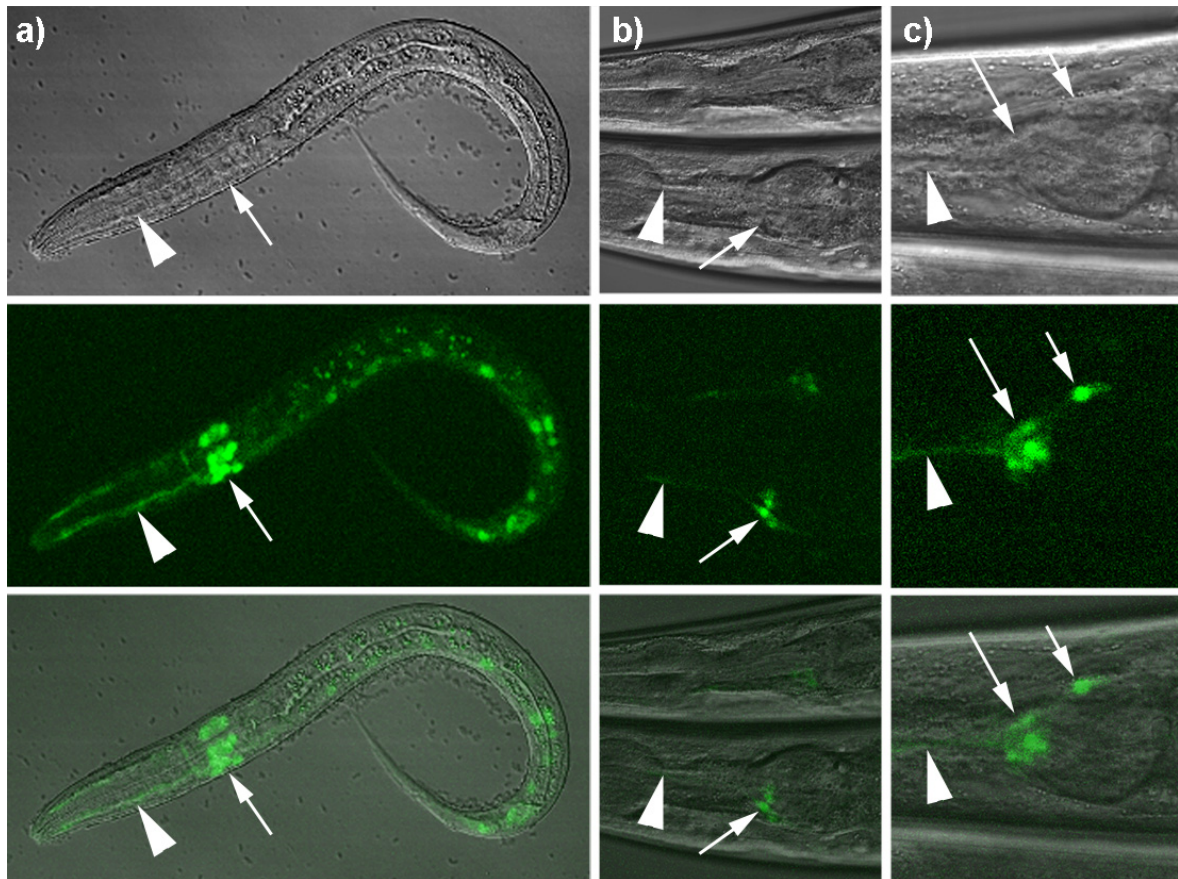


Abbildung 19: Expression des GFP::SMO-1 Fusionsprotein. **a)** Es ist eine Larve des L1 Stadiums abgebildet. Auffällig ist die starke Expression in den Neuronen im Kopfbereich (Pfeil) sowie deren Axone (Pfeilspitze), die in Richtung Schlundöffnung verlaufen. Die kleinen, punktuellen Strukturen entlang des Körpers entsprechen keiner GFP Expression, sondern sind die Eigenfluoreszenz der typischen Darmgranula. Entlang der Körperachse sind weitere Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren, zu erkennen, die genaue Identität dieser Zellen wurde nicht bestimmt. **b)** und **c)** zeigen jeweils den Kopfbereich von adulten Hermaphroditen. Das GFP::SMO-1 Protein ist in den Neuronen in diesem Bereich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert.

Die *pha-1* Mutante wurde als Selektionssystem für Transformanten genutzt (siehe Material und Methoden). Die erhaltenen stabilen Linien wurden auf die Expression des GFP::SMO-1 Fusionsproteins hin untersucht.

Für das GFP::SMO-1 Fusionsprotein konnte unter diesen Bedingungen keine frühe embryonale Expression detektiert werden. Eine starke Expression in Neuronen in den verschiedenen Larvenstadien und in adulten Hermaphroditen wurde detektiert (Abbildung 19). Zu den exprimierenden Zellen gehören Zellen des ventralen Nervenstrangs und Neuronen im Kopf und Schwanz. Die Lokalisierung in diesen Zellen ist sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch, wobei die nukleäre Lokalisierung stärker zu sein scheint. Ebenso konnte Expression in verschiedenen Zellen der somatischen Gonade detektiert werden. Diese Expression wurde schon von L. Broday und Mitarbeitern (2004) beschrieben.

Meine Beobachtungen in *C.elegans* in dieser Arbeit und bisherige Veröffentlichungen (Broday *et al.*, 2004) sehen keine Hinweise auf eine Expression des SMO-1 Proteins in der Keimbahn bzw. im frühen Embryo. In anderen Organismen (Mensch, Maus, Ratte und Arabidopsis) ist SUMO als ubiquitär exprimiertes Protein bekannt, wobei die Stärke der Expression von Gewebe zu Gewebe variieren kann (Boddy *et al.*, 1996; Golebiowski *et al.*, 2003; Kurepa *et al.*, 2003).

Ein Grund für die nicht detektierte Expression des Fusionsproteins während der Embryonalentwicklung kann wie bei dem ULP-1::GFP Experiment jedoch in der keimbahnspezifischen Unterdrückung des Gens auf dem extrachromosomalen Array liegen.

(Über-) Expression von reifen SUMO in der Mutante *ulp-1 (t1530)*

Die DeSUMOylierungsproteine oder Ubiquitin ähnlichen Proteasen haben zwei verschiedene Aufgaben. Die erste Funktion ist das Abspalten einer oder mehrerer Aminosäuren vom C-terminus des translatierten SUMO Proteins. Durch diese Abspaltung erhält das SUMO Protein sein charakteristisches und essentielles Glycin-Glycin-Motiv, mit dem es an die Zielproteine über eine Peptidbindung gebunden wird. Die zweite Funktion ist die Reversion der posttranslationalen Modifizierung durch SUMO, die DeSUMOylierungsaktivität. Hier wird die vorher

geknüpfte Peptidbindung zwischen dem Glycin-Glycin-Motiv und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein gespalten.

Es sollte getestet werden, welche der beiden Funktionen für den Phänotyp in der Mutante verantwortlich ist. Die erste Funktion der Protease wird umgangen, indem reifes SUMO in der Mutante (über-)exprimiert wird, um zu überprüfen welche dieser beiden Funktionen für den Phänotyp in der Mutante verantwortlich ist. Für diesen Zweck wurde ein Konstrukt mit den 3'- und 5'-untranslatierten genomischen Regionen und dem ORF von *smo-1* hergestellt, in dem das letzte, für die Aminosäure Phenylalanin kodierende Triplett vor dem Stoppcodon deletiert wurde. Dieses wurde in die *ulp-1* (*t1530*) Mutante transformiert und die Mutante wurde auf Veränderungen im Phänotyp untersucht.

Aus den Transformationsexperimenten ging lediglich eine stabile Linie hervor, die nur sehr wenige lebende Nachkommen hervorbrachte, die den Transformationsmarker trugen. Dieses kann als ein Indiz gesehen werden, dass eine (Über-) Expression von reifem SUMO in der Mutante einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der heterozygoten Mutante hat. Die Transformationsraten in anderen Experimenten, z.B. Komplementationsexperimenten, ist wesentlich höher und bei „normalen“ stabilen Linien tragen ca. 70 bis 90% der Nachkommen den entsprechenden Marker. Ein anderer Stamm (*pha-1*) wurde ebenfalls mit dem gleichen Konstrukt transformiert, als Transformationsmarker wurde ein die *pha-1* Mutation komplementierender Vektor benutzt. Es wurden zwei stabile Linien isoliert, die im Vergleich mit der *ulp-1* Mutante nicht die geringe prozentuale Weitergabe der extrachromosomalen Arrays zeigen.

Die einzige stabile Linie die aus den Transformationsexperimenten mit der *ulp-1* (*t1530*) Mutante hervorging, wurde mit der 4D-Mikroskopie untersucht. Die analysierten Embryonen zeigten einen veränderten Phänotyp.

Es gibt in diesen Embryonen Hinweise auf eine allgemeine, nicht auf eine Zelllinie beschränkte, fehlerhafte Regulation des Zellzyklus. In Wildtyp Embryonen und in den meisten Mutanten, die Defekte in frühen Zellschicksalsspezifizierungen haben, verlängern sich die Zeiten zwischen den Mitosen während der Proliferationsphase immer von Zellzyklus zu Zellzyklus. In den analysierten Embryonen gibt es Zellen, die während der Proliferationsphase einen längeren

Zellzyklus haben als ihre Tochterzellen, die dann fast normale Zellzyklen bis zur nächsten Teilung aufweisen.

Außerdem zeigen diese Embryonen einen Phänotyp, der von einer embryonal letalen Mutante in einem anderen Gen (*pie-1*) bekannt war. In mutanten Embryonen entwickeln sich wie an den rein morphologischen Kriterien der Darmgranula zu sehen ist, Darmzellen aus der P₂-Zelllinie, die im Wildtyp als somatische Schicksale nur Hypodermis-, Körpermuskel- und einige Nervenzellen hervorbringt. Der Darm entsteht im Wildtyp und in der *ulp-1* Mutante nur aus der Gründerzelle E, die die posteriore Tochter der EMS Zelle ist (Abbildung 20a).

Die analysierten homozygoten *ulp-1* Embryonen, die das reife SUMO Protein von einem extrachromosomalen Array exprimieren, haben die Darmgranula nicht nur in den Nachkommen der E Blastomere, sondern zum Beispiel auch in den Nachkommen der D Blastomere (Abbildung 20, Daap und Dapa). Damit konnte eine Verbindung zwischen der SUMOylierung und dem PIE-1 Protein hergestellt werden.

Die ursprüngliche Frage, wegen derer das Experiment durchgeführt wurde, welches der beiden ULP-1 Funktionen, für den in der *ulp-1* Mutante auftretenden Phänotyp verantwortlich ist, kann mit den erzielten Ergebnissen nicht beantwortet werden. Aber in einer glücklichen Fügung hat sich eine Funktion von *ulp-1* ergeben, die das Potential hat, die bisher unerklärlichen Defekte bei der Spezifizierung der somatischen Gründerzelle MS zu erklären.

Die Ergebnisse deuten auf ein Protein (PIE-1) hin, das möglicherweise durch SUMO reguliert wird. Die Entstehung von Darmzellen aus der P₂ Zelllinie ist sowohl in *pie-1* Mutanten (Goldstein, 1995) als auch in den *ulp-1* Embryonen, die das reife SUMO (über-) exprimieren, zu beobachten. Die Funktion von PIE-1 wird deshalb im Folgenden näher beschrieben werden.

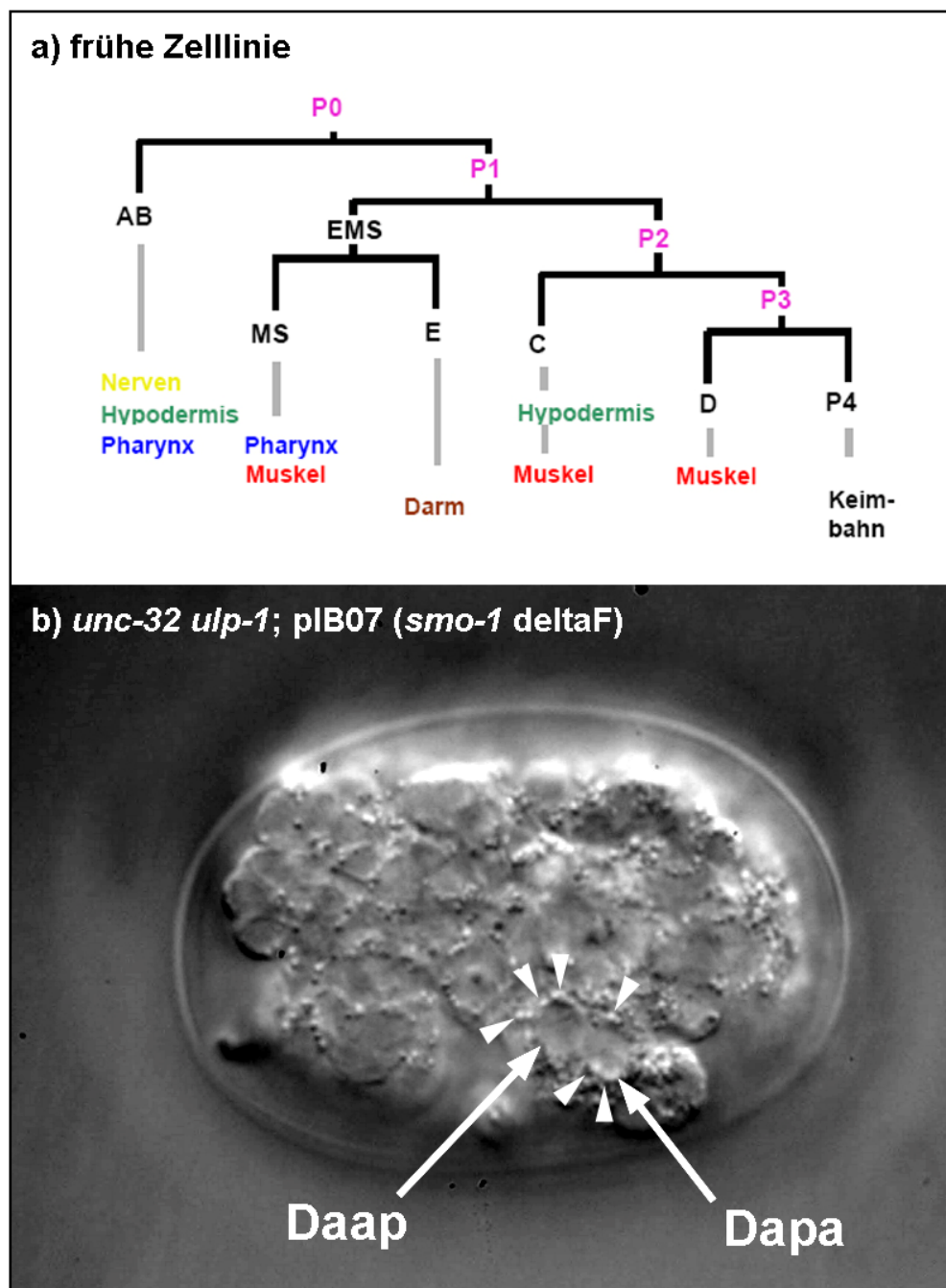


Abbildung 20: **a)** Die frühe Zelllinie von *C.elegans*. Die Zygote P_0 und die weiteren Keimbahnvorläuferzellen teilen sich asymmetrisch und geben jeweils nach anterior eine somatische Blastomere ab, aus denen dann die unten angegebenen Gewebe entstehen. Im Wildtyp, als auch in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante entsteht der Darm exklusiv aus der Blastomere E. **b)** *ulp-1* (*t1530*) Embryo, in dem das reife SUMO (*SMO-1* ΔF) (über-)exprimiert wird. Die Zellen Daap und Dapa enthalten die Darmgranula (Pfeilspitzen), die spezifisch für Darmzellen sind. Im Wildtyp entstehen aus der D Blastomere nur Körpermuskelzellen, die andere charakteristische Merkmale aufweisen.

Theoretischer Hintergrund PIE-1

Das *pie-1* („pharynx and intestine in excess“) Gen kodiert für ein CCCH-Zinkfinger Protein, das maternal für die Keimbahndetermination essentiell ist. Das Protein wird während jeder Teilung der Keimbahnzellen asymmetrisch aufgeteilt (Mello *et al.*, 1996). Der Großteil des Proteins wird in die posteriore Keimbahnzelle weitergegeben und ist nach kurzer Zeit hauptsächlich im Kern lokalisiert. In der anterioren somatischen Tochterzelle verbleibt PIE-1 im Cytoplasma und wird schnell degradiert. Durch verschiedene Experimente, die hauptsächlich in dem Labor von G. Seydoux durchgeführt wurden, konnten einige Phänome, wie die asymmetrischen Aufteilung zu den Keimbahnzellen oder die Degradation in den somatischen Zellen ansatzweise aufgeklärt werden (DeRenzo *et al.*, 2003; Reese *et al.*, 2000).

Die Funktion des Proteins liegt zum einen in der Unterdrückung der Genexpression in den Keimbahnzellen, zum anderen hat PIE-1 zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Translation von maternalen mRNAs im Cytoplasma der Keimbahnzellen (Seydoux und Strome, 1999). Die Unterdrückung der Genexpression in den Keimbahnzellen erfolgt über die Regulation einer Untereinheit der RNA-Polymerase II. Der genaue Mechanismus der Regulation ist bisher nicht bekannt. Bisher publizierte Daten zeigen, dass die aktivierend wirkende Phosphorylierung der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II abhängig von der Abwesenheit des PIE-1 Proteins ist. In Keimbahnzellen, in denen PIE-1 lokalisiert ist, liegt die C-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II unphosphoryliert vor. Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der RNA-Polymerase II beginnt kurz nachdem das Protein PIE-1 in diesen Zellen abgebaut wird. Auch in *Drosophila* liegt die unphosphorylierte Form der CTD in Keimbahnzellen vor (Seydoux und Dunn, 1997). Die Transkription in den Keimbahnzellen in *pie-1* Mutanten ist aktiv und die CTD der RNA-Polymerase II in diesen Zellen liegt phosphoryliert vor (Seydoux und Dunn, 1997; Seydoux *et al.*, 1996). Eine ektopische Expression von *pie-1* in somatischen Zellen bewirkt eine Reduzierung von neu transkribierten mRNAs (Seydoux *et al.*, 1996).

PIE-1 als mögliches Zielprotein für die SUMOylierung?

Es stellte sich die Frage, ob PIE-1 durch SUMO reguliert wird und welchen Einfluss eine mögliche SUMOylierung von PIE-1 hat. In den bisherigen Publikationen über PIE-1 sind keine posttranslationalen Modifikationen durch SUMO beschrieben worden. Mit Hilfe des Programms SUMOplot™ der Firma Abgent (<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>) wurde eine potentielle SUMOylierungsstelle (Lysin 68) im PIE-1 Protein vorhergesagt. Das Lysin (Position 68) liegt in einer Konsensussequenz (67-PKRE-70).

Hinweise auf den Einfluss der SUMOylierung auf das PIE-1 Protein ergaben sich aus zwei Publikationen (Reese *et al.*, 2000; Tenenhaus *et al.*, 2001). Reese *et al.*, beschreiben ein Deletionskonstrukt, in dem PIE-1 mit GFP fusioniert wurde und in dem die Aminosäuren 64 bis 84 des PIE-1 Proteins deletiert wurden. Dieses Protein zeigt eine reduzierte Lokalisation im Zellkern der Keimbahnzellen (Reese *et al.*, 2000). Tenenhaus und Mitarbeiter (2001) verdeutlichen, dass Mutationen nahe der potentiellen SUMOylierungsstelle eine reduzierte Lokalisation im Zellkern der Keimbahnzellen bewirken. Daraus leitete sich die Arbeitshypothese für die folgenden Experimente ab. Das PIE-1 Protein wird durch SUMO posttranslational modifiziert und dadurch wird die Kernlokalisation von PIE-1 reguliert. Diese Hypothese wurde mit den folgenden Experimenten überprüft.

PIE-1::GFP Expression im Wildtyp Hintergrund

Die Lokalisierung des PIE-1 Proteins unterliegt einer starken Dynamik in der frühen Embryonalentwicklung (Abbildung 21). In einer gerade befruchteten Zygote ist das Protein gleichmäßig im Cytoplasma verteilt. Anschließend kommt es zu einer Abnahme im anterioren Bereich und einer Zunahme des PIE-1::GFP Signals im posterioren Bereich des Embryos. Zum Zeitpunkt der Vorkernverschmelzung ist der größte Anteil des PIE-1 Proteins im posterioren Embryo lokalisiert. Während der Mitose akkumuliert das Protein an den Centrosomen, wobei das posteriore Centrosom höhere Proteinkonzentrationen aufweist. Als Konsequenz der asymmetrischen Aufteilung vor und während der Mitose kommt es nach der Zellteilung zu einer Anreicherung des PIE-1 Proteins in der Keimbahnvorläuferzelle P₁. Während der Interphase ist ein Großteil des Proteins im Zellkern

lokalisiert. In den weiteren Keimbahnvorläuferzellen P_2 , P_3 und P_4 (jeweils die posteriore Tochter der vorangegangenen Keimbahnvorläuferzelle) kommt es wiederholt zu einer asymmetrischen Aufteilung des Proteins. Die nukleäre Lokalisierung des Proteins in der Interphase wird von Zellteilung zu Zellteilung stärker (Abbildung 21).

Vor jeder Zellteilung kommt es zu einer Verminderung der PIE-1 Konzentration auf der Seite der Zelle, die als nächstes die somatische Blastomere bildet. Zu Beginn jeder Mitose verschwindet die Kernlokalisierung und das PIE-1 Protein lokalisiert an den Centrosomen beider Enden der neu gebildeten Spindel. Während der fortschreitenden Mitose verlagert sich der größte Teil des Proteins in kürzester Zeit in Richtung des posterioren Bereiches. Begleitend verringert sich der Proteinanteil, der an dem anterioren Centrosom lokalisiert ist, während sich der Anteil des am posterioren Centrosoms lokalisierten PIE-1 vergrößert. Nach der Cytokinese ist der größte Teil des PIE-1 Proteins in der Keimbahnvorläuferzelle detektierbar. Die somatischen Tochterzellen enthalten nur geringe Mengen des Proteins. Dieses in den somatischen Zellen lokalisierte Protein wird abgebaut und ist eine Zellteilungsrunde später in den Töchtern nicht mehr detektierbar. Die asymmetrische Aufteilung des PIE-1 Proteins endet bei der Mitose von P_4 , deren Töchter (Z2/Z3) Keimbahnzellen sind und sich postembryonal in die Keimbahn weiterentwickeln (Mello *et al.*, 1996; Reese *et al.*, 2000; Tenenhaus *et al.*, 1998). In den beiden Nachkommen der P_4 Blastomere (Z2/Z3) ist das PIE-1 Protein zu Beginn noch detektierbar. Im 100 Zell-Stadium der Embryogenese ist das Protein dann nicht mehr nachweisbar (Seydoux und Dunn, 1997).

Neben der Aufteilung des PIE-1 Proteins zwischen Kern und Cytoplasma sind in den einzelnen Kompartimenten Sublokalisationen zu erkennen. Das PIE-1 Protein im Cytoplasma ist an den keimbahnspezifischen P-Granula lokalisiert (Mello *et al.*, 1996). Auch im Kern ist das PIE-1 Protein in granulären Strukturen lokalisiert. Die Identität dieser Strukturen ist noch nicht geklärt (Reese *et al.*, 2000).

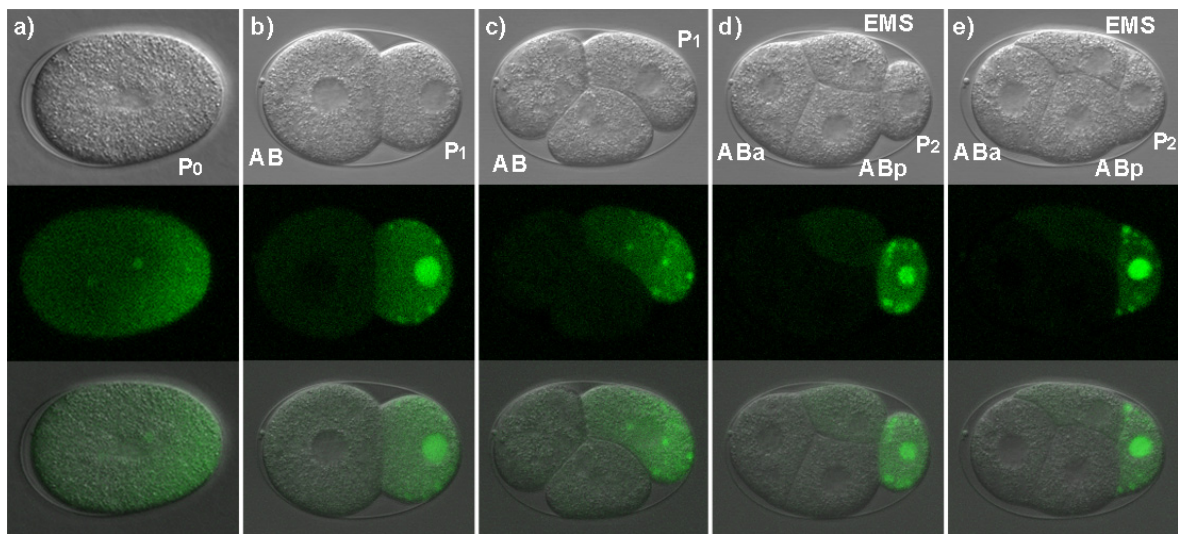


Abbildung 21: Verteilung des PIE-1 Proteins in der frühen Embryonalentwicklung. In der oberen Reihe sind die Embryonen mittels Nomarski-Optik dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt das detektierte Signal des PIE-1::GFP Proteins, die untere Reihe ist eine Überlagerung der beiden oberen Bilder. In den Nomarskibildern sind neben den Zellen die Bezeichnungen der frühen Zellen eingetragen. Anterior ist links, posterior rechts. **a)** späte Zygote (P_0) kurz nach der Vorkernverschmelzung. Das PIE-1 Protein ist asymmetrisch verteilt und zum Teil an den Centrosomen lokalisiert. **b)** 2-Zell Embryo in der Interphase, das PIE-GFP ist vorwiegend in dem Kern der posterioren Keimbahnvorläuferzelle P_1 lokalisiert. Die punktuellen Strukturen im Cytoplasma dieser Zelle stellen die P-Granula dar. **c)** 2-Zell Embryo, in der sich die AB Blastomere kurz vor der Cytokinese befindet. Das PIE-1::GFP Protein zeigt eine asymmetrische Aufteilung zwischen dem Bereich, der die somatischen Blastomere EMS hervorbringt und dem Bereich der Zelle, der zur Keimbahnvorläuferzelle P_2 wird. Wie bei jeder Teilung ist das Protein an den Centrosomen lokalisiert und zu diesem Zeitpunkt weist das posteriore Centrosom ein stärkeres Signal als das anteriore Centrosom auf. **d)** Frühes 4-Zell Stadium. **e)** Spätes 4-Zell Stadium desselben Embryos. Im Vergleich der beiden Embryonen im 4-Zell Stadium erkennt man die Zunahme des PIE-1::GFP Signals im Kern der Keimbahnvorläuferzelle P_2 . Zudem kommt es zur sukzessiven Degradation des PIE-1 Proteins in der somatischen Zelle EMS.

Die Expression des PIE-1 Proteins ist nicht auf die frühe Embryogenese beschränkt. Das Protein ist auch in verschiedenen Neuronen von *C.elegans* exprimiert (Pfeile in Abbildung 22a). In diesen Neuronen liegt das PIE-1 Protein im Kern vor. Für die Expression in den Neuronen ist bisher keine Funktion bekannt, da homozygote *pie-1* Mutanten keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen, der auf eine Funktion von PIE-1 in diesen Neuronen hinweist. Alle bekannten *pie-1* Mutanten sind jedoch maternal letal und ein vollständiger Funktionsverlust konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

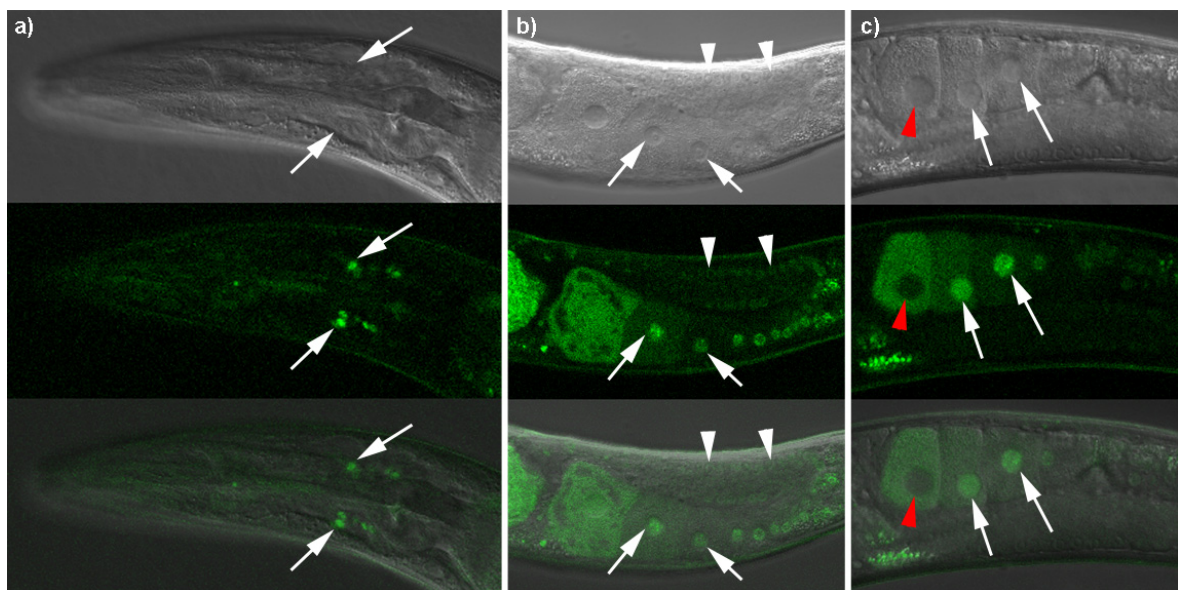


Abbildung 22: Expression des PIE-1::GFP Proteins in Neuronen des Kopfbereiches und in heranreifenden Oozyten der Gonade. Obere Reihe Nomarski-Optik, GFP Signal mittlere Reihe, unten Überlagerung. **a)** Die Expression des Fusionsproteins ist in einzelnen Zellkernen direkt vor dem zweiten Bulbus zu erkennen (Pfeile). Aufgrund der Lage der Zellen kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Neuronen handelt. **b)** Expression in der Gonade adulter Hermaphroditen. Im oberen Teil sieht man kleinere Keimbahnzellen, die das PIE-1::GFP exprimieren (Pfeilspitzen). Im zeitlichen Verlauf wird die Expression stärker (Pfeile). Das PIE-1::GFP Protein wird in Oozyten, die kurz vor der Befruchtung sind, aus dem Kern in das Cytoplasma transferiert. **c)** In dieser Gonade erkennt man die Dynamik des Fusionsproteins. In der letzten Oozyte vor der Befruchtung ist das PIE-1::GFP Protein fast ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert (rote Pfeilspitze), während die noch nicht ganz herangereiften Oozyten (Pfeile), noch eine starke Kernlokalisierung des Proteins aufweisen.

Eine maternale Expression des Proteins lässt sich nicht nur genetisch, sondern auch anhand der Lokalisierung des PIE-1 Proteins in der Gonade der adulten Hermaphroditen zeigen (Abbildung 22). Das Protein ist in Keimbahnzellen exprimiert, die sich in einem Frühstadium der Entwicklung zur Oozyte befinden (Pfeilspitzen in Abbildung 22b). In diesen Zellen ist das PIE-1 Protein im Kern lokalisiert. In den reifen Oozyten, die kurz vor der Befruchtung stehen, ist das Protein cytoplasmatisch lokalisiert (rote Pfeilspitze in Abbildung 22c).

Die Expression und Lokalisierung des PIE-1 Proteins wurde mit einem Stamm durchgeführt, der ein C-terminales Fusionsprotein mit dem GFP Protein exprimiert (PIE-1::GFP) (Reese *et al.*, 2000). Die beschriebenen Expressionen und Lokalisierungen des PIE-1 Proteins in den Embryonen sind identisch mit vorher beschriebenen Untersuchungen (Mello *et al.*, 1996; Reese *et al.*, 2000; Tenenhaus *et al.*, 1998). Die nukleäre Expression in den Keimbahnzellen der Gonade und die Expression in den Neuronen der adulten Hermaphroditen wurden bisher nicht beschrieben.

PIE-1::GFP im *ulp-1 (t1530)* Hintergrund

Der PIE-1::GFP exprimierende Stamm wurde mit der *ulp-1 (t1530)* Mutante gekreuzt, um die Expression und Lokalisation des Proteins in dem mutanten Hintergrund zu analysieren.

Die homozygoten *ulp-1 (t1530)* Hermaphroditen, die das PIE-1::GFP exprimierten, zeigten einen neuen Phänotyp. Wird der Stamm bei 25°C inkubiert, werden die homozygoten *ulp-1* Hermaphroditen steril. Diese Sterilität tritt nicht bei Temperaturen zwischen 15°C und 20°C auf. Diese auftretende Sterilität deutet auf eine Wechselwirkung der *ulp-1 (t1530)* Mutation und der Expression des PIE-1::GFP Proteins hin. Die Temperaturabhängigkeit kann durch das Allel *t1530* erklärt werden, da bei niedrigeren Temperaturen ein schwächerer Phänotyp auftritt (siehe Temperaturabhängigkeit des Phänotyps).

Es konnten keine abnormalen Lokalisierungen des PIE-1::Proteins bei einer Temperatur von 20°C beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die homozygoten *ulp-1* Hermaphroditen bei 20°C angezogen und 12 bis 20 Stunden vor der Analyse bei 25°C inkubiert.

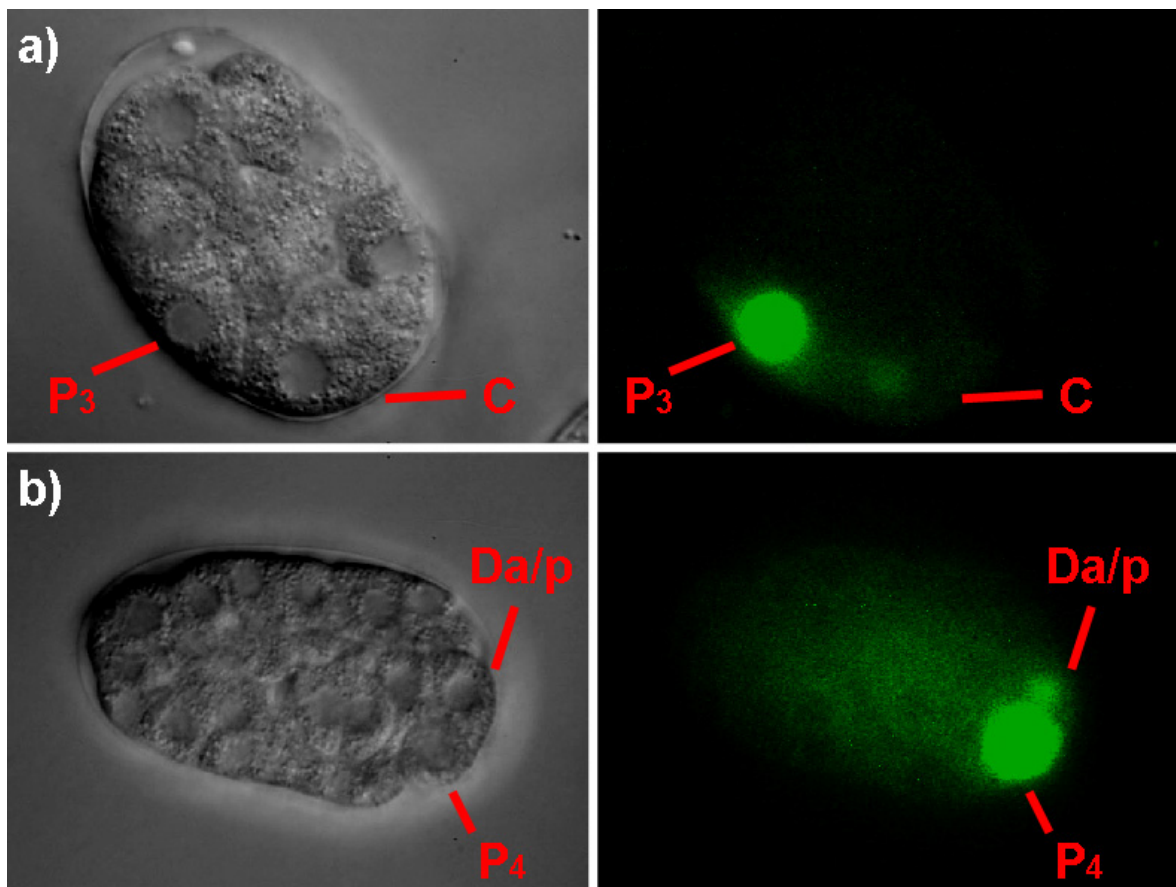


Abbildung 23: Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins im Zellkern somatischer Zellen in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante. In der linken Spalte sind die Nomarski Bilder, in der rechten das detektierte GFP Signal der Embryonen dargestellt. Aufgrund der asymmetrischen Aufteilung des PIE-1 Proteins ist das detektierte Signal in den Keimbahnvorläuferzellen (P_3/P_4) stärker als in den somatischen Zellen. **a)** In diesem Embryo ist das PIE-1::GFP Fusionsprotein im Zellkern der somatischen Blastomere C zu erkennen. Diese Kernlokalisierung des Proteins kann nicht in Wildtyp Embryonen detektiert werden. **b)** Dieser Embryo eines späteren Stadiums weist eine Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in einer Tochterzelle der D Blastomere auf (die andere Tochterzelle ist in einer anderen Ebene). In Wildtyp Embryonen ist das PIE-1 Protein nicht in den Kernen der Zellen Da oder Dp detektierbar und nahezu komplett abgebaut.

Embryonen dieser Hermaphroditen zeigten eine Misslokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in den Zellkernen von somatischen Blastomeren (Abbildung 23). Es konnte ein GFP-Signal in den Zellkernen der somatischen Zellen C bzw. D nachgewiesen werden. Dieses wird im Folgenden näher erläutert.

Die Zellkernlokalisation von PIE-1 ist abhängig von der SUMOylierung des Proteins. In den somatischen Zellen der *ulp-1 (t1530)* Embryonen wird PIE-1 nicht deSUMOyliert. Ein Teil des Proteins lokalisiert deshalb im Zellkern, wo es die Transkription im Gegensatz zu normalen Embryonen reprimiert. Der Prozess der Degradation des Proteins ist in der Mutante ebenfalls betroffen, das Protein wird verlangsamt abgebaut. In Wildtyp Embryonen kommt es zu einem schnellen Ubiquitin abhängigen Abbau des Proteins in den somatischen Zellen (DeRenzo *et al.*, 2003), so dass in den Tochterzellen kaum noch PIE-1 Protein detektierbar ist. Das PIE-1 Protein wird in der *ulp-1 (t1530)* Mutante jedoch nicht so schnell abgebaut. Dieses erklärt sich entweder indirekt, durch die Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins oder direkt, durch eine antagonistische Funktion von SUMO auf die ubiquitinabhängigen Degradation des Proteins. Unabhängig wie der verlangsamte Abbau zustande kommt, führt die Kernlokalisation zu einer Repression der Transkription in den somatischen Zellen.

Damit kann die verringerte Anzahl an Körpermuskelzellen in der *ulp-1 (t1530)* Mutante (siehe Immunfluoreszenzfärbungen) durch die Lokalisierung des PIE-1 Proteins in den Zellkernen der Blastomeren C und D verursacht sein. Die Blastomeren C und D tragen zu einem Großteil der entstehenden Körpermuskelzellen in *C.elegans* bei. Von den 81 Körpermuskelzellen, die während der Embryogenese entstehen, stammen 32 von der Blastomere C und 20 von D ab. In der *ulp-1 (t1530)* Mutante ist die Anzahl jedoch nicht um 52 oder mehr Zellen verringert, sondern im Durchschnitt nur um 44 Zellen. Die MS Blastomere wird in der Mutante nicht vollständig spezifiziert (siehe oben). Eine vergleichbare unvollständige Spezifizierung der Blastomeren C und D könnte ein Grund für die Defekte sein. Andererseits wurde auch eine direkte Expression von ULP-1 in den Muskelzellen detektiert. Eine Funktion des Proteins während der Differenzierung der Körpermuskelzellen kann nicht ausgeschlossen werden.

Das Protein PIE-1 reprimiert vor allem die Transkription. Die Lokalisierung des Proteins in den somatischen Zellkernen der *ulp-1* Mutante könnte eine verminderte Expression von zellspezifischen Genen zur Folge haben, die für die Spezifizierung der somatischen Zellen wichtig ist. Die normal verlaufende asymmetrische Aufteilung des PIE-1 Proteins in der *ulp-1* Mutante führt dazu,

dass ein geringer Anteil des Proteins in den somatischen Zellen lokalisiert ist. Die Repression der Transkription in diesen Zellen ist deshalb nicht stark genug, um das somatische Schicksal komplett zu unterdrücken.

Es wurde auch untersucht, ob die Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in der *ulp-1* Mutante bereits in 4-Zell Embryonen ektopisch im Zellkern der somatischen Zelle EMS zu detektieren ist (Abbildung 24). Die EMS Blastomere ist die Schwesterzelle der Keimbahnvorläuferzelle P₂ und hat die in der *ulp-1* Mutante am stärksten betroffene Blastomere MS als direkten Nachkommen. Wie in den vorherigen Experimenten wurde der heterozygote Stamm bei 20°C angezogen und dann 12 bis 20 Stunden vor der Analyse bei einer Temperatur von 25°C inkubiert.

Während das PIE-1::GFP Fusionsprotein in der EMS Blastomere des Wildtyps größtenteils zwischen Cytoplasma und Kern gleich verteilt ist (Kern/Cytoplasma Verhältnis $1,04 \pm 0,23$; n=7), kann in den EMS Zellkernen der *ulp-1* (*t1530*) Mutante ein stärkeres GFP-Signal im Verhältnis zum Cytoplasma detektiert werden (Kern/Cytoplasma Verhältnis $1,41 \pm 0,18$; n=5; $P < 0,02$). Die Experimente wurden an einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Das Programm (LSM Image Examiner, Zeiss) zur Auswertung der aufgenommenen Bilder ermöglicht es die Intensitäten des detektierten GFP Signals in verschiedenen Bildausschnitten miteinander zu vergleichen. Für die Analysen wurden die durchschnittlichen Pixelwerte von zufällig ausgewählten Bereichen des Kerns und des Cytoplasmas derselben Zelle in Verhältnis gesetzt (genaue Berechnungen siehe Material und Methoden).

Die verstärkte Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins in der EMS Blastomere der *ulp-1* Embryonen bewirkt in dieser Zelle eine Unterdrückung der Transkription (Seydoux *et al.*, 1996). Daraus resultiert die unvollständige Spezifizierung der MS Blastomere, die in der *ulp-1* Mutante sichtbar ist.

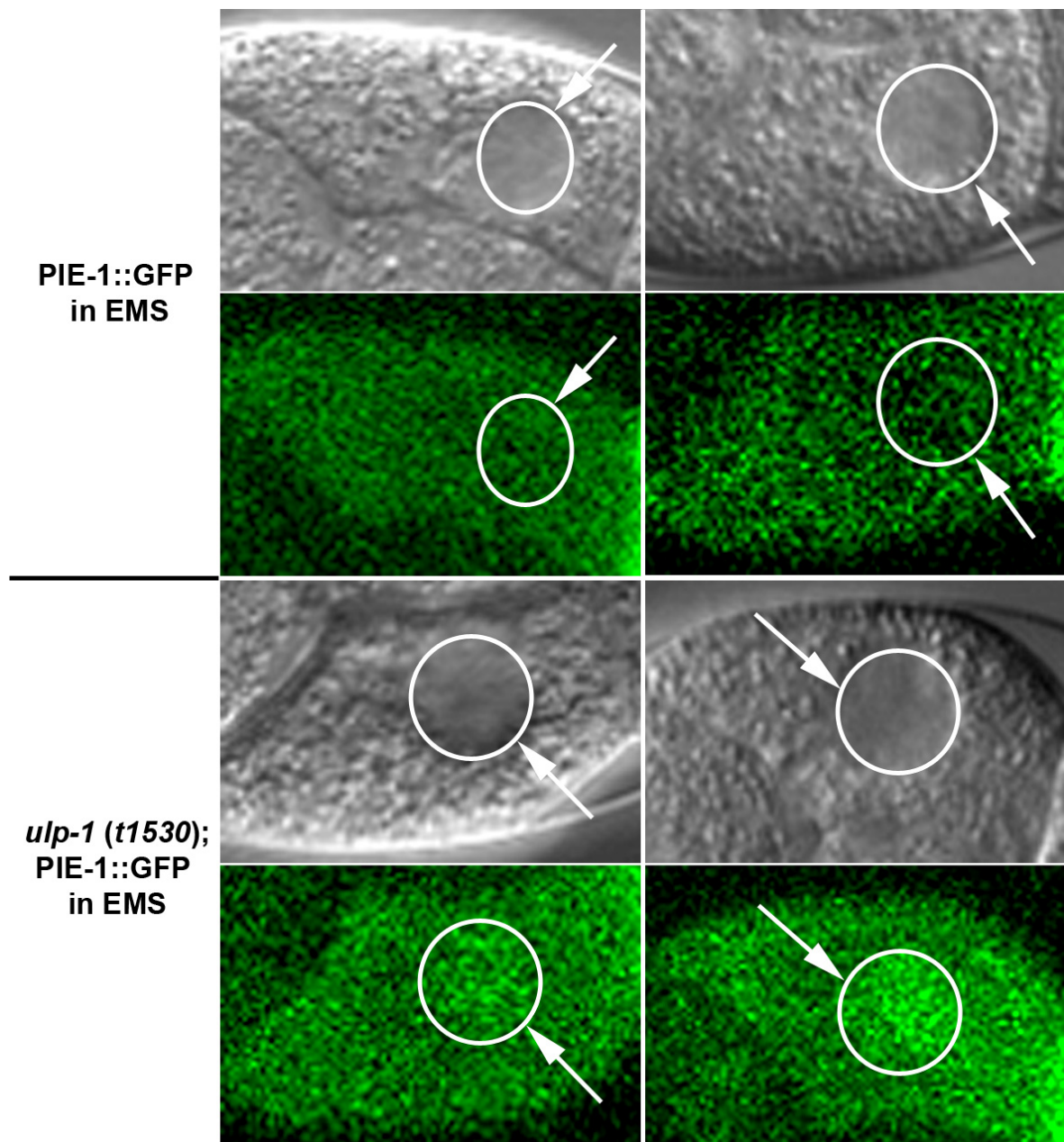


Abbildung 24: Lokalisierung des PIE-1::GFP Fusionsproteins in der EMS Blastomere der *ulp-1 (t1530)* Mutante. Oben sind jeweils die Nomarski Bilder und das detektierte GFP-Signal in der EMS Blastomeren ist unten dargestellt. Es sind jeweils zwei Beispiele für PIE-1::GFP im Wildtyp und in der *ulp-1 (t1530)* Mutante abgebildet. Die Kreise deuten die Position des Zellkerns in den einzelnen Bildern an.

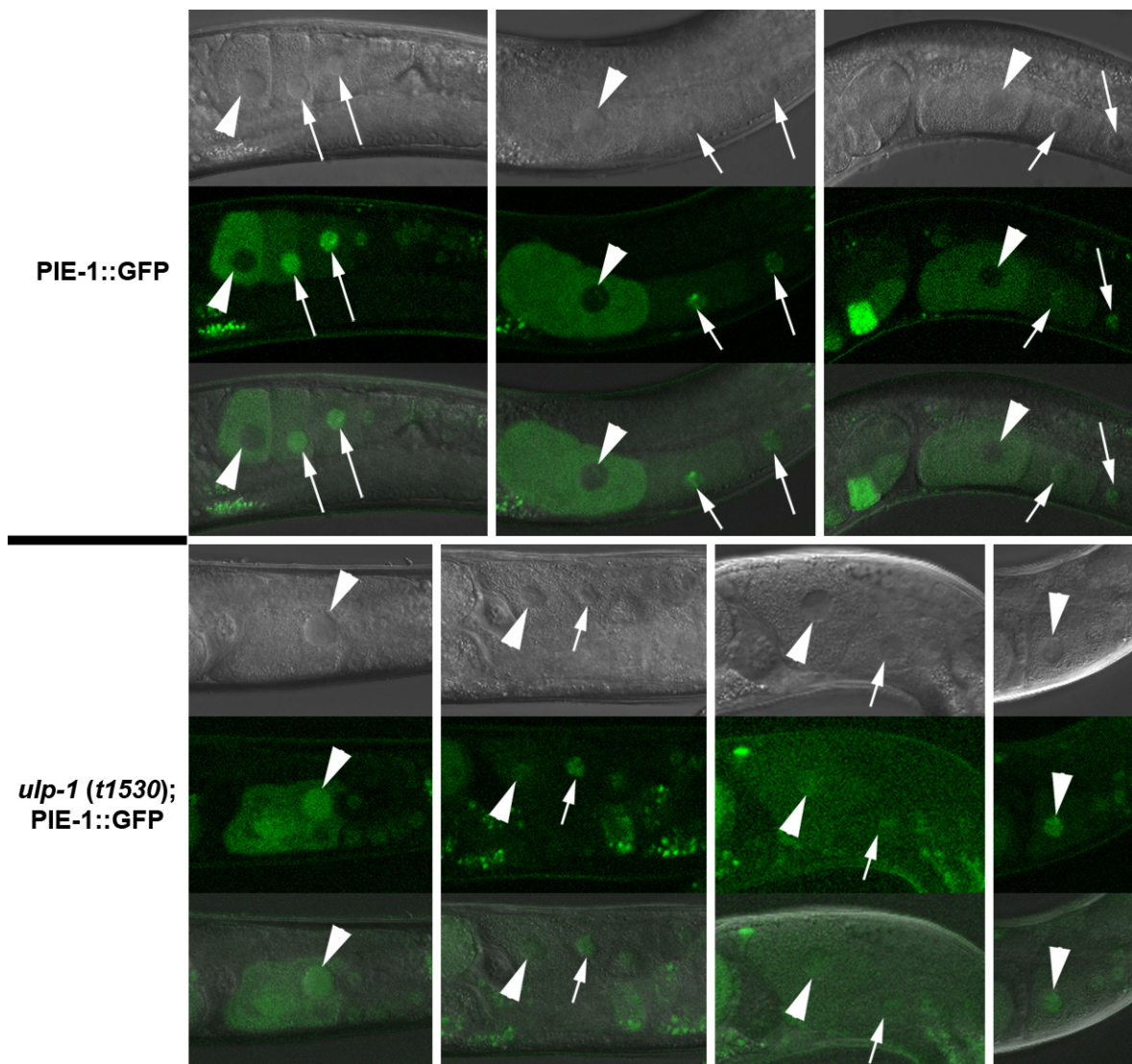


Abbildung 25: Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in den reifenden Oozyten der *ulp-1 (t1530)* Mutante. In der oberen Reihe ist der Wechsel des Proteins zwischen Kern und Cytoplasma im Wildtyp dargestellt. In der unteren Reihe sind Oozyten der *ulp-1 (t1530)* Mutante abgebildet. Die Pfeile zeigen auf Zellkerne der reifenden Oozyten. Die Lokalisierung des Proteins in der Mutante ist in diesen Oozyten nicht verändert. Die Pfeilspitzen deuten auf die Zellkerne reifer Oozyten, die kurz vor der Befruchtung stehen. Diese Kerne enthalten in der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp das PIE-1::GFP Protein.

In den reifenden Oozyten wechselt das PIE-1::GFP Protein ebenfalls zwischen Kern und Cytoplasma. In frühen Oozyten ist das Protein kernlokalisiert (Pfeile in Abbildung 25). In den kurz vor der Befruchtung stehenden Oozyten ist das Protein im Cytoplasma detektierbar (Pfeilspitzen in Abbildung 25). Dieser Wechsel ist in der *ulp-1 (t1530)* Mutante beeinträchtigt. In den frühen Oozyten liegt das Protein wie im Wildtyp im Kern lokalisiert vor (Pfeile). In der *ulp-1 (t1530)* Mutante ist das PIE-1::GFP Protein auch in den reifen Oozyten kernlokalisiert (Pfeilspitzen). Der Einfluss der SUMOylierung auf die Lokalisierung des PIE-1 Proteins ist in den Oozyten vergleichbar mit dem Einfluss im frühen Embryo. Die verringerte DeSUMOylierungsaktivität in der Mutante resultiert in einer bleibenden Kernlokalisierung des Proteins in den reifen Oozyten.

PIE-1 Antikörper

Die Sterilität der *ulp-1 (t1530)* Hermaphroditen, die das PIE-1::GFP bei 25°C exprimieren, limitieren die Analysen der PIE-1 Lokalisierung in Embryonen. Die Misslokalisierung des PIE-1 Proteins in der Mutante musste deshalb mit spezifischen Antikörpern analysiert werden.

Es wurde ein für PIE-1 spezifischer monoklonaler Antikörper benutzt (Tenenhaus *et al.*, 1998). Die Färbungen mit diesem Antikörper zeigten zunächst überraschenderweise nicht die gleiche Verteilung des PIE-1 Proteins wie in den Analysen mit dem PIE-1::GFP Fusionsprotein.

Der monoklonale Antikörper detektiert das PIE-1 Protein hauptsächlich im Cytoplasma und nicht im Zellkern der frühen Wildtypembryonen (Pfeile in Abbildung 26). In allen Embryonalstadien ist keine bzw. nur geringe Färbung in den Zellkernen der Keimbahnzellen detektierbar. Die asymmetrische Aufteilung des PIE-1 Proteins ist mit diesem Antikörper zu erkennen, da eine stärkere Färbung in den posterioren Keimbahnzellen detektiert wird.

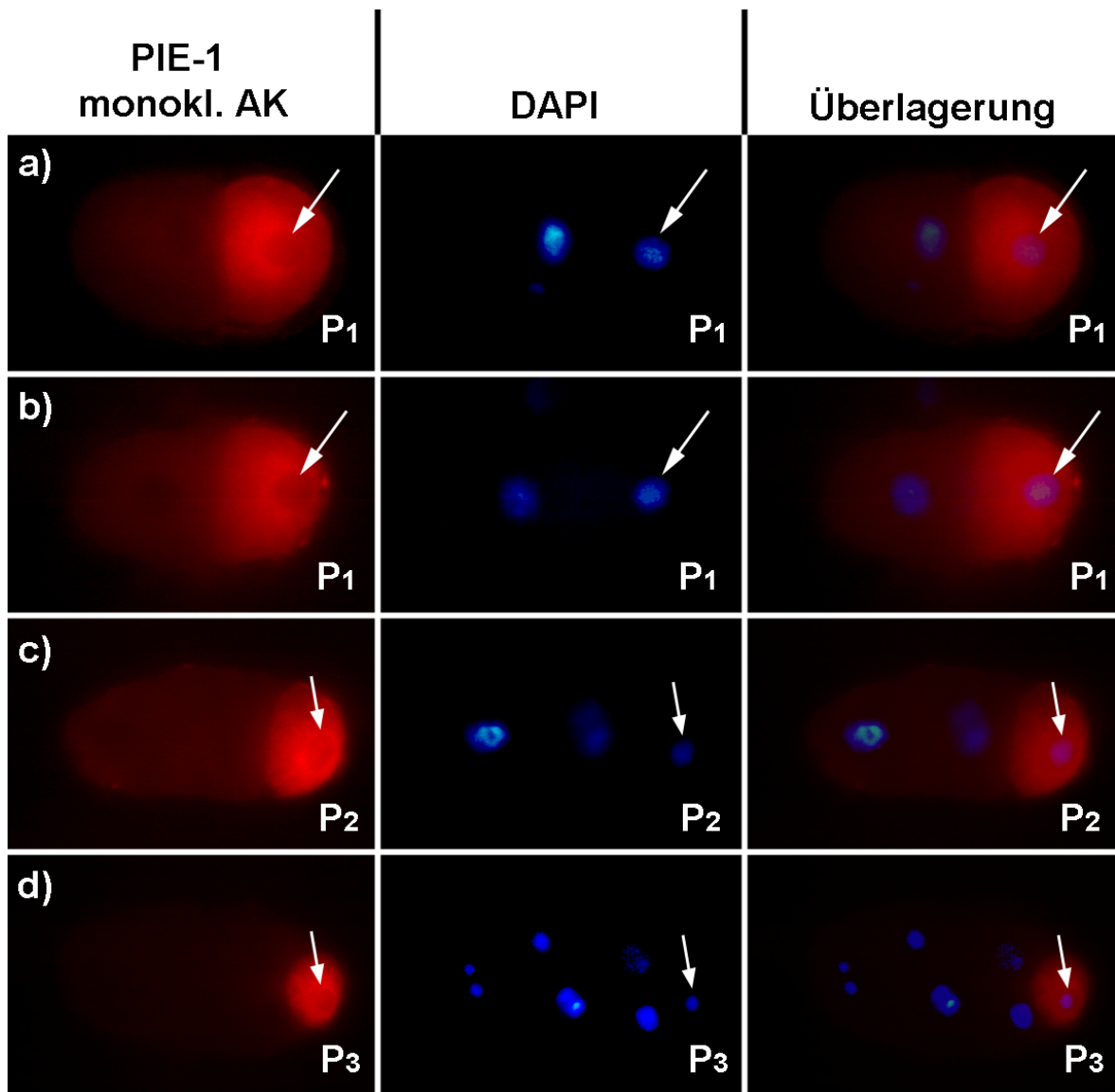


Abbildung 26: Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbungen von frühen Wildtyp Embryonen mit dem monoklonalen Antikörper gegen das PIE-1 Protein. Anterior links, posterior rechts. In der linken Spalte sind die Immunfluoreszenzfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper gegen PIE-1 zu sehen. In der Mitte sind dieselben Embryonen mit DAPI gefärbt, um die Zellkerne zu lokalisieren, rechts ist die Überlagerung. **a) / b)** 2-Zell Embryonen. **c)** Embryo im 4-Zell Stadium. **d)** Embryo in einem späteren Stadium, zu sehen ist in diesem Fall die Keimbahnvorläuferzelle P₃. Das PIE-1 Protein wird von diesem Antikörper in allen Fällen nahezu ausschließlich im Cytoplasma der Keimbahnvorläuferzellen detektiert. Das im Zellkern enthaltene PIE-1 Protein wird nur schwach bzw. nicht von dem Antikörper detektiert. Die Pfeile zeigen auf die Zellkerne der Keimbahnvorläufer P₁, P₂ und P₃.

Im Gegensatz zu den Immunfluoreszenzfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper ist der größte Teil des PIE-1::GFP Fusionsproteins im Zellkern lokalisiert. Ein polyklonaler Antikörper zeigt dieselben Lokalisierungen, die man mit dem PIE-1::GFP Protein beobachtet (Mello *et al.*, 1996), der größte Teil des PIE-1 Proteins ist während der Interphase im Zellkern der Keimbahnzellen detektierbar. Das Peptid, das für die Herstellung dieses polyklonalen Antikörpers benutzt wurde, entspricht den Aminosäuren 134 bis 157 des PIE-1 Proteins (Mello *et al.*, 1996).

Für die Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurde mit einem Peptid immunisiert, das den Aminosäuren 54 bis 73 im PIE-1 Protein entspricht (Tenenhaus *et al.*, 1998). Dieser Teil des PIE-1 Proteins beinhaltet die potentielle SUMOylierungsstelle (Lysin 68).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Antikörperfärbungen im Vergleich mit den Lokalisierungsexperimenten mit dem PIE-1::GFP Fusionsprotein können dadurch erklärt werden, dass der monoklonale Antikörper, der nur das cytoplasmatische PIE-1 Protein detektiert, lediglich eine spezielle Form des Proteins erkennt. Vermutlich erkennt dieser Antikörper nur das nicht SUMOylierte PIE-1, da die potentielle SUMOylierungsstelle in dem Teil des Proteins liegt, das zur Herstellung des Antikörpers verwendet wurde. Der polyklonale Antikörper zeigt die gleiche Aufteilung des PIE-1 Proteins wie das PIE-1::GFP Fusionsprotein und so lässt sich vermuten, dass dieser Antikörper beide Formen, die SUMOylierte wie die nicht SUMOylierte, detektiert.

Diese Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, dass der monoklonale Antikörper lediglich die nicht SUMOylierte Form des PIE-1 Proteins. Wenn dies richtig ist, muss das kernlokalisierte PIE-1 Protein zum Großteil SUMOyliert sein.

Expression des mutanten Fusionsproteins PIE-1::GFP K68A

Um diese Hypothese zu testen, wurde das PIE-1 Protein in der potentiellen SUMOylierungsstelle verändert und die Lokalisierung des mutierten Proteins wurde analysiert. Da in PIE-1 nur eine Konsensusstelle für die SUMOylierung zu finden ist, wurde das Lysin in dieser Konsensussequenz durch eine *in vitro* Mutagenese ausgetauscht. Durch diese Mutation sollte das PIE-1 Protein in allen Zellen nicht mehr SUMOyliert werden können und das nicht SUMOylierte Protein sollte dann *in vivo* hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert sein.

Ein Teil des PIE-1::GFP Konstruktes wurde durch PCR amplifiziert und dabei wurde das Triplet, das für die Aminosäure Lysin an der Position 68 in dem PIE-1 Protein kodiert, in ein Triplet für Arginin geändert. Nachdem die mutierte Sequenz überprüft wurde, wurde die entsprechende Sequenz in dem PIE-1::GFP Vektor durch die mutierte Form ersetzt (das resultierende Fusionsprotein wird im weiteren als PIE-1::GFP K68A bezeichnet).

PIE-1::GFP K68A im *pha-1* Hintergrund

Das PIE-1::GFP K68A Konstrukt wurde zunächst in den temperatursensitiven Stamm *pha-1* (e2123) transformiert. Der *pha-1* Stamm dient als Selektionssystem für Transformanten (Granato *et al.*, 1994).

Aus den Transformationsexperimenten gingen drei unabhängige stabile Linien hervor. Diese Linien wurden zunächst auf die Keimbahnexpression des PIE-1::GFP K68A Proteins hin untersucht. Zwei dieser Linien exprimierten das mutierte PIE-1::GFP nicht in der Keimbahn, es konnte nur die somatische Expression in den Neuronen beobachtet werden. Die dritte stabile Linie exprimierte das mutierte PIE-1::GFP K68A sowohl somatisch (Neuronen) als auch in der Keimbahn. Diese stabile Linie wurde dann auf die Lokalisierung des PIE-1::GFP K68A Proteins untersucht. Die Untersuchungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop durchgeführt, damit die Verteilung des mutierten Fusionsproteins nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ übergeprüft werden kann.

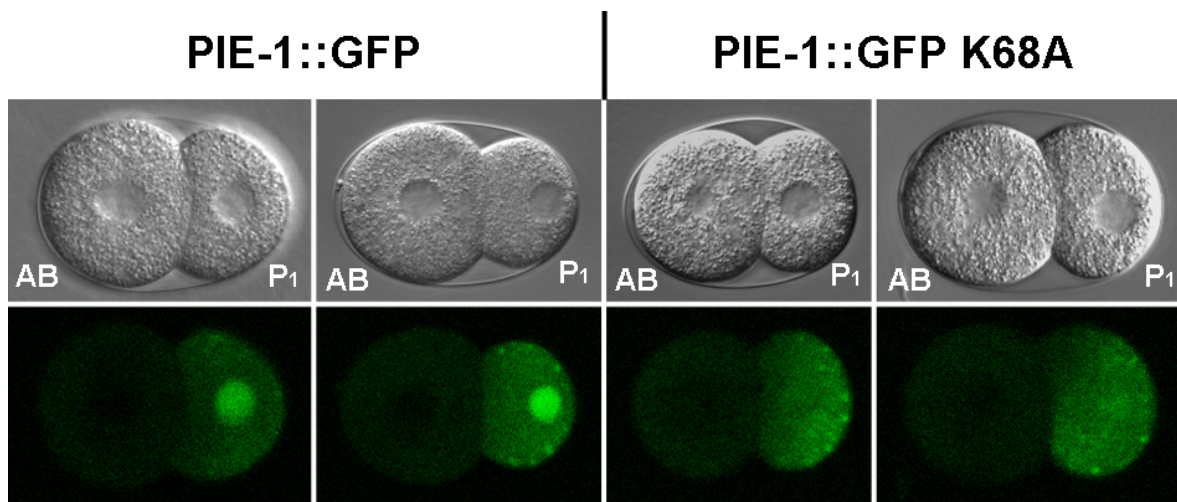


Abbildung 27: Veränderte Verteilung des PIE-1::GFP K68A Proteins zwischen Kern und Cytoplasma in 2-Zell Embryonen. Die Namen der beiden Zellen sind jeweils angegeben. Auf der linken Seite sind zwei Beispiele der Wildtyp Form des Fusionsproteins abgebildet, rechts zwei Beispiele für die mutierte Form. In den unteren GFP Bildern sind die Unterschiede in der Verteilung der Proteine zwischen Kern und Cytoplasma deutlich zu erkennen. Während ein Großteil des Wildtyp Protein (links) im Kern lokalisiert ist, ist der Kern bei der mutierten Form (rechts) nicht durch das GFP Signal zu erkennen.

Die Embryonen, die das mutierte PIE-1::GFP K68A Protein exprimierten, weisen in den frühen Stadien der Entwicklung (2-Zell und 4-Zell Embryonen) im Vergleich zu der nicht mutierten Form des PIE-1::GFP Proteins eindeutige Unterschiede in der Verteilung des PIE-1 Proteins auf. Während der größte Teil des Wildtyp PIE-1 Proteins in der Interphase von 2-Zell Embryonen im Zellkern der Keimbahnvorläuferzelle P_1 lokalisiert ist, ist das Verhältnis der mutierten Form zwischen Kern und Cytoplasma nahezu gleich (Abbildung 27). Im 4-Zell Stadium ist das Verhältnis des detektierten PIE-1::GFP K68A Proteins im Vergleich mit der nicht mutierten Form des Proteins in der Keimbahnvorläuferzelle P_2 stärker in Richtung Cytoplasma verschoben (Abbildung 28).

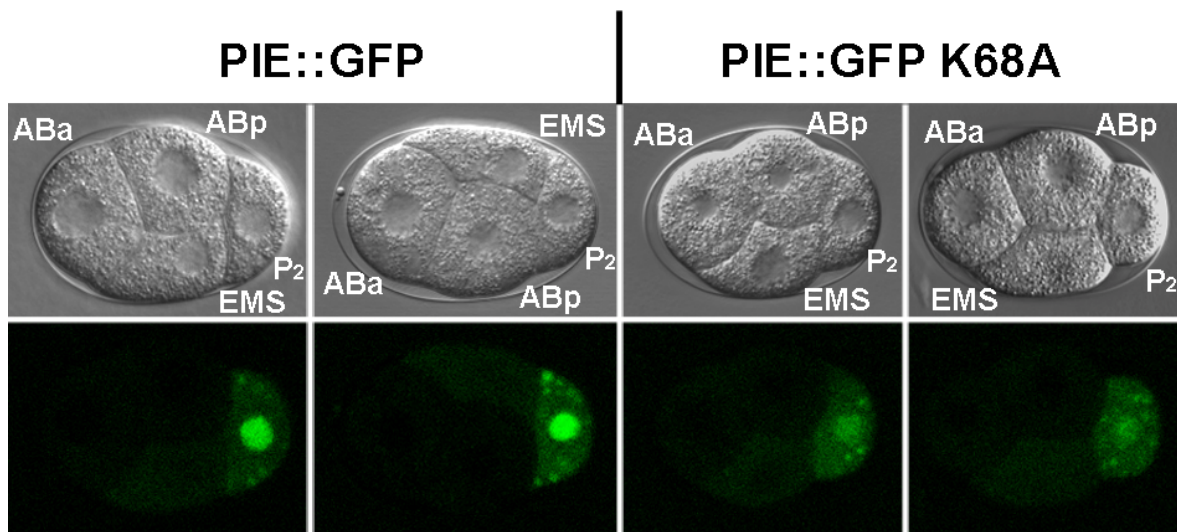


Abbildung 28: Verteilung des PIE-1::GFP K68A Proteins zwischen Kern und Cytoplasma im Vergleich mit dem Wildtypprotein in 4-Zell Embryonen. Gezeigt sind die gleichen Embryonen wie in der Abbildung zuvor zu einem späteren Zeitpunkt. Die Namen der Zellen sind angegeben. Im 4-Zell Stadium ist wiederum ein Unterschied zwischen der Wildtyp Form und der mutierten Form des PIE-1 Fusionsproteins zu erkennen. In diesem Stadium ist das mutierte PIE-1::GFP K68A Protein schwächer als die nicht mutierte Form im Zellkern der Keimbahnvorläuferzelle P₂ detektierbar. Das Verhältnis zwischen Kern und Cytoplasma ist verändert.

Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm (LSM Image Examiner, Zeiss) zur Auswertung der Bilddaten analysiert, um die qualitativen Ergebnisse zusätzlich quantitativ zu unterstützen. Hierfür wurden die durchschnittlichen Pixelwerte von zufällig ausgewählten Bereichen des Kern und des Cytoplasmas in Verhältnis gesetzt (genaue Berechnungen siehe Material und Methoden).

Das Verhältnis der Pixelwerte aus Kern und Cytoplasma der 2-Zell Embryonen, die die Wildtypform des PIE-1::GFP exprimieren, liegt im Durchschnitt bei $2,69 \pm 0,38$. Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis bei der mutierten Form deutlich geringer ($1,16 \pm 0,14$; $P < 0,001$), das detektierte GFP ist nahezu gleich verteilt. In den 4-Zell Embryonen sind die Verhältnisse beider Formen größer, was der schon oben beschriebenen vermehrten Kernlokalisierung entspricht. Der Unterschied ist auch in diesem Stadium eindeutig zwischen der mutierten ($1,89 \pm 0,40$; $P < 0,001$) und der Wildtyp Form ($3,29 \pm 0,52$) (Abbildung 29).

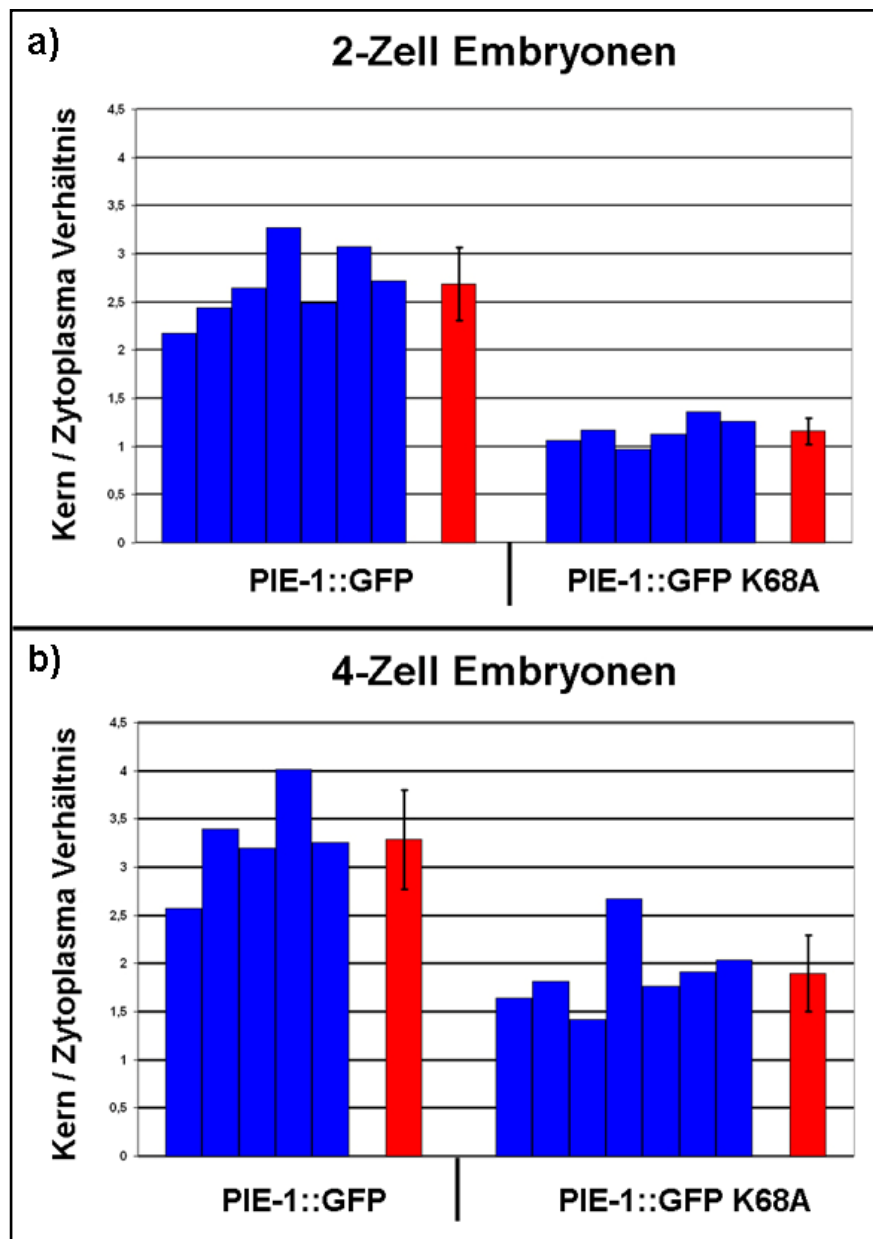


Abbildung 29: Verhältnisse der Pixelwerte zwischen Kern und Cytoplasma in den PIE-1::GFP und den PIE-1::GFP K68A exprimierenden Embryonen. Blau eingefärbt sind die Werte für einzelne Embryonen, rot steht für den Durchschnittswert. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen. **a)** 2-Zell Embryonen. **b)** 4-Zell Embryonen.

Noch ein interessanter Unterschied in der Lokalisierung des PIE-1::GFP K68A Proteins im Vergleich zu der Wildtyp Form ist während der frühen Zellteilungen zu beobachten. Das PIE-1::GFP K68A Protein ist im Gegensatz zum Wildtyp Protein nicht mit den Centrosomen kolokalisiert (Abbildung 30).

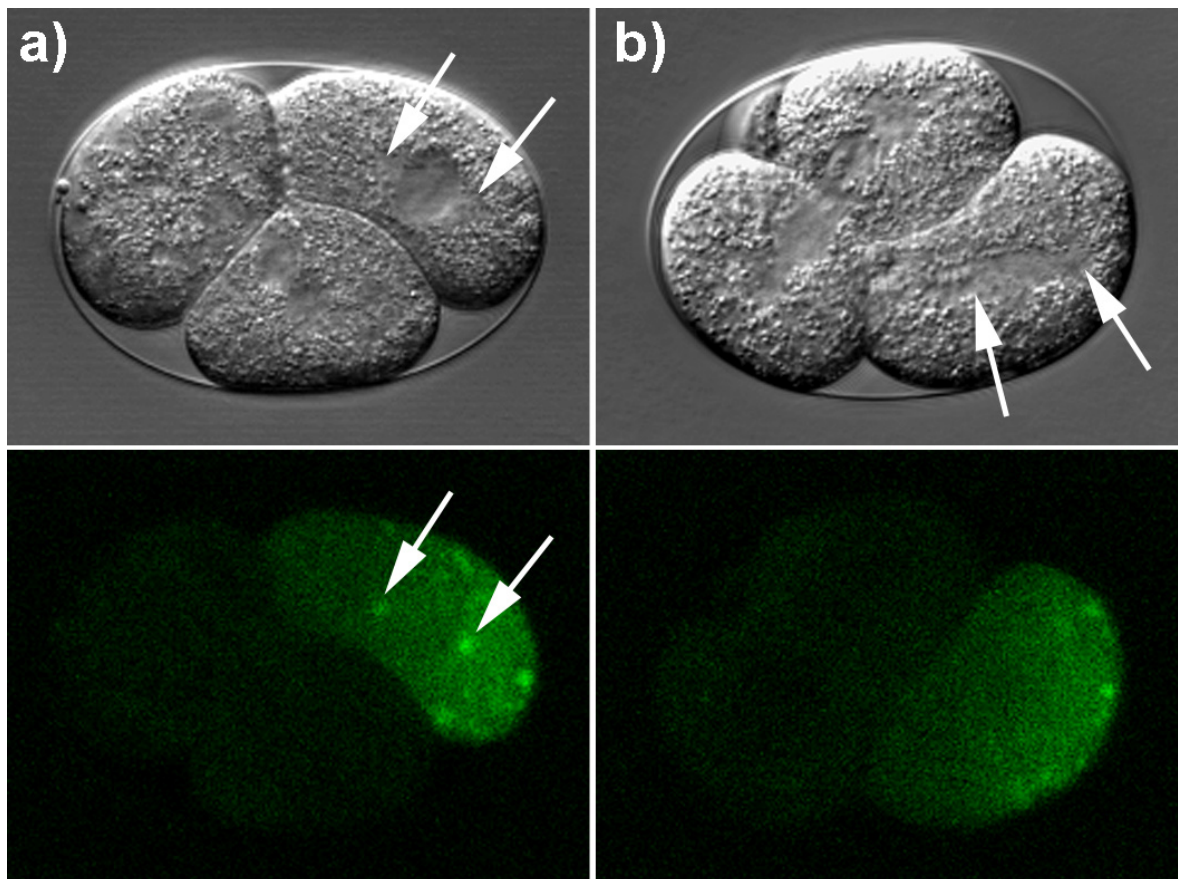


Abbildung 30: Das mutierte PIE-1::GFP K68A Fusionsprotein ist während der Mitose nicht mehr zu den Centrosomen lokalisiert. Beide Embryonen befinden sich in der P_1 -Teilung. **a)** Embryo der Wildtyp Form des PIE-1:GFP Proteins exprimiert. Die Lokalisierung zu den Centrosomen ist deutlich zu erkennen (Pfeile). **b)** Das Fusionsprotein, in dem die potentielle SUMOylierungsstelle mutiert ist, lokalisiert nicht zu den Centrosomen. Die Pfeile in der Nomarski Abbildung deuten auf die Centrosomen.

Wie oben beschrieben, wechselt das PIE-1 Protein in den heranreifenden Oozyten der Gonade von adulten Hermaphroditen zwischen Cytoplasma und Kern. Es wurde überprüft, ob die mutierte Form des PIE-1::GFP K68A Proteins

auch in den reifenden Oozyten eine unterschiedliche Lokalisierung im Vergleich zur Wildtyp Form des Proteins aufweist und dies ist tatsächlich der Fall.

Diese Veränderung ist noch eindeutiger als in den Keimbahnzellen der frühen Embryonen. Das Fusionsprotein PIE-1::GFP K68A ist in diesen Zellen fast ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 31).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation des PIE-1::GFP K68A Proteins in den verschiedenen Stadien der Entwicklung deutlich zu der Lokalisation der Wildtypform des Proteins unterscheidet. Das Lysin 68, die potentielle SUMOylierungsstelle des PIE-1 Proteins, ist für die Kernlokalisierung und für die Lokalisierung zu den Centrosomen während jeder Zellteilung der Keimbahnzellen wichtig. Jedoch kann auch die mutierte Form des PIE-1 Fusionsproteins noch im Kern der Keimbahnvorläuferzellen detektiert werden. Falls eine SUMOylierung essentiell für die Kernlokalisierung ist, wäre zu erwarten, dass das Protein ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist. Eine mögliche Erklärung für die geringe Kernlokalisierung in diesen Experimenten wäre ein Einfluss des endogenen PIE-1 Proteins. Einen vergleichbaren Einfluss des endogenen PIE-1 Proteins auf eingebrachte mutierte Formen des Proteins konnte schon früher beobachtet werden (Reese *et al.*, 2000). Die Ergebnisse von Reese *et al.* (2000) lassen die Interpretation zu, dass das PIE-1 Protein Dimere oder Multimere bilden kann und dadurch auch mutierte Versionen des Proteins in ihrem Lokalisierungsverhalten beeinflussen kann. Die endogene (SUMOylierte) Form bildet ein Dimer oder Multimer mit der eingebrachten, mutierten Version und somit werden beide Proteine in den Zellkern transportiert.

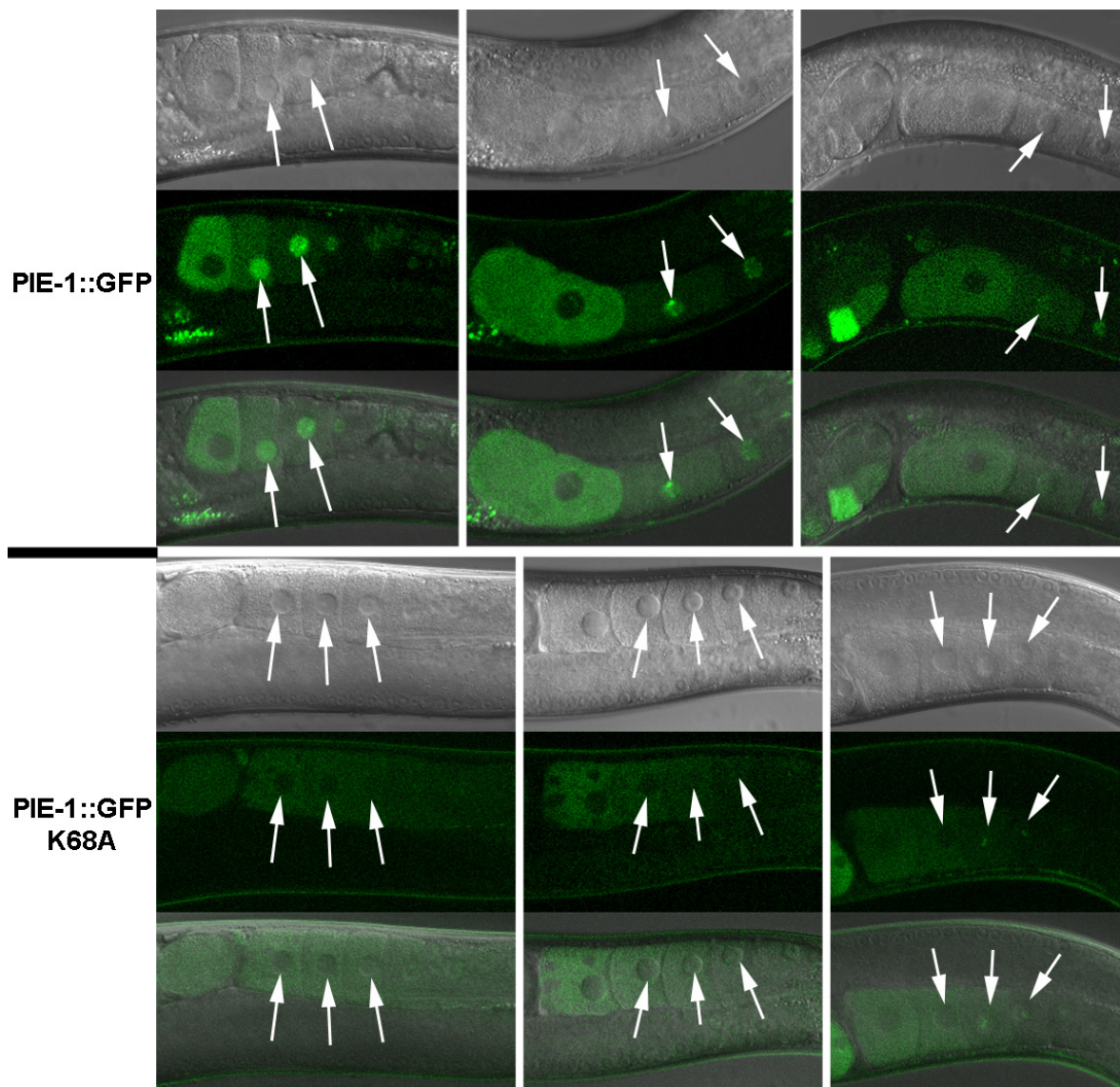


Abbildung 31: Lokalisierung des PIE-1::GFP K68A Fusionsproteins in den reifenden Oozyten. In der oberen Reihe sind Beispiele für die Lokalisierung der Wildtyp Form des Fusionsproteins abgebildet. In den Keimbahnzellen, sowie in den heranreifenden Oozyten, liegt das Protein im Kern lokalisiert vor (Pfeile obere Reihe). Während der Reifung kommt es zu einer vermehrten cytoplasmatischen Lokalisierung. Die letzte Oozyte vor der Befruchtung (in diesen Bildern immer die am weitesten links liegende) weist keine Kernlokalisation des Proteins auf. In der unteren Reihe ist die Lokalisierung der mutierten Form des Fusionsproteins (PIE-1::GFP K68A) dargestellt. Dieses Protein zeigt in fast allen Fällen eine rein cytoplasmatische Lokalisierung (Pfeile). Lediglich in einigen heranreifenden Oozyten sind punktuelle Strukturen in den Zellkernen zu erkennen (drittes Beispiel, rechts).

PIE-1::GFP K68A im *pie-1* Hintergrund

Die Hypothese, ob das endogene PIE-1 Protein einen Einfluss auf die Lokalisierung der mutierten Form hat, kann getestet werden, indem die mutierte PIE-1::GFP K68A Form in einer *pie-1* Mutante analysiert wird. Die *pie-1 (zu154) unc-25 /qC1* Mutante wurde dazu mit dem PIE-1::GFP K68A Konstrukt transformiert. Als Selektionsmarker diente für die Transformation der *pie-1 (zu154)* Mutante ein Plasmid (pPD118.33; siehe Materiel und Methoden), das das GFP spezifisch in den Pharynxmuskelnzellen (durch den *myo-2* Promotor) exprimiert.

In der F1 Generation konnten Transformanten identifiziert werden (n=31), diese wurden auf die Weitergabe des extrachromosomalen Arrays kontrolliert. Zwei der F1 Transformanten segregierten den Transformationsmarker in die F2 Generation mit einer geringen Effizienz. Unter den für den Transformationsmarker positiven Nachkommen in der F2 Generationen befanden sich keine homozygoten *pie-1 (zu154)* Hermaphroditen. Alle positiven heterozygoten Hermaphroditen brachten in der F3 keine Nachkommen hervor, die für den Transformationsmarker positiv waren.

Die Analyse des PIE-1::GFP K68A Fusionsprotein in dem *pie-1 (zu154)* Hintergrund war nicht möglich. Ein Aussterben der stabilen Linien in der F3 Generation bzw. eine Nichtweitergabe des extrachromosomalen Arrays an die Nachkommen der F3 Generation kann durch einen letalen Einfluss des eingebrachten Expressionskonstruktes begründet sein.

PIE-1::GFP in *smo-1 (ok359)*

Durch die Untersuchungen an den Embryonen und adulten Tieren, die das PIE-1::GFP K68A Protein exprimierten, konnte gezeigt werden, dass die potentielle SUMOylierungsstelle (Lysin 68 im PIE-1 Protein) essentiell für die Lokalisierung des Proteins in den Kern ist. Die Mutation K68A des PIE-1 Fusionsproteins bewirkt eine verstärkte cytoplasmatische Lokalisierung des Proteins.

Das PIE-1 Protein sollte in der Deletionsmutante von SUMO (*smo-1 (ok359)*) vermehrt oder ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert sein. Es ist nicht möglich, Embryonen (bzw. reifende Oozyten) zu analysieren, die kein SMO-1 Protein

enthalten, da die *smo-1* Mutante maternal gerettet wird und die homozygoten Tiere steril sind. Es wurde dennoch ein Stamm hergestellt, der das PIE-1::GFP in dem *smo-1* (*ok359*) Hintergrund exprimiert, um anhand der somatischen Expression in den Neuronen Hinweise auf die Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins zu erhalten.

In dem konstruierten Stamm *smo-1* (*ok359*) *dpy-5* (*e61*)/hT2; +/hT2; PIE-1::GFP konnte eine temperaturabhängige Veränderung des Phänotyps beobachtet werden. Wird der Stamm bei 25°C inkubiert, weisen schon einige der heterozygoten Hermaphroditen Sterilität auf. Dieser Temperatureffekt ist vergleichbar mit der temperaturabhängigen Sterilität in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante. Die Sterilität in den verschiedenen Linien könnte auf eine Misslokalisierung des PIE-1::GFP Proteins zurückzuführen sein, da die beiden Gene *smo-1* und *ulp-1* in demselben Signalweg eine Funktion einnehmen und diese posttranslationale Modifikation die Lokalisierung des zusätzlich exprimierten PIE-1::GFP beeinflusst.

Für die Analyse der Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in den somatischen Neuronen in dem *smo-1* Hintergrund wurden heterozygote Hermaphroditen im L4 Stadium bei 25°C inkubiert. Die in der nächsten Generation entstehenden, für *smo-1* (*ok359*) homozygoten Tiere wurden dann mit dem konfokalen Mikroskop untersucht.

Im Wildtyp Hintergrund ist das PIE-1::GFP Protein wie in den embryonalen Keimbahnvorläuferzellen oder in den frühen Oozyten im Kern lokalisiert (Pfeile in Abbildung 32a). In den Neuronen der *smo-1* (*ok359*) Mutante ist das PIE-1::GFP Protein im Cytoplasma lokalisiert (Pfeile in Abbildung 32b). Das PIE-1::GFP Fusionsprotein kann nicht im Zellkern der Neuronen der *smo-1* (*ok359*) Mutante detektiert werden. Das Fusionsprotein liegt cytoplasmatisch vor, während im Wildtyp der Zellkern GFP positiv ist.

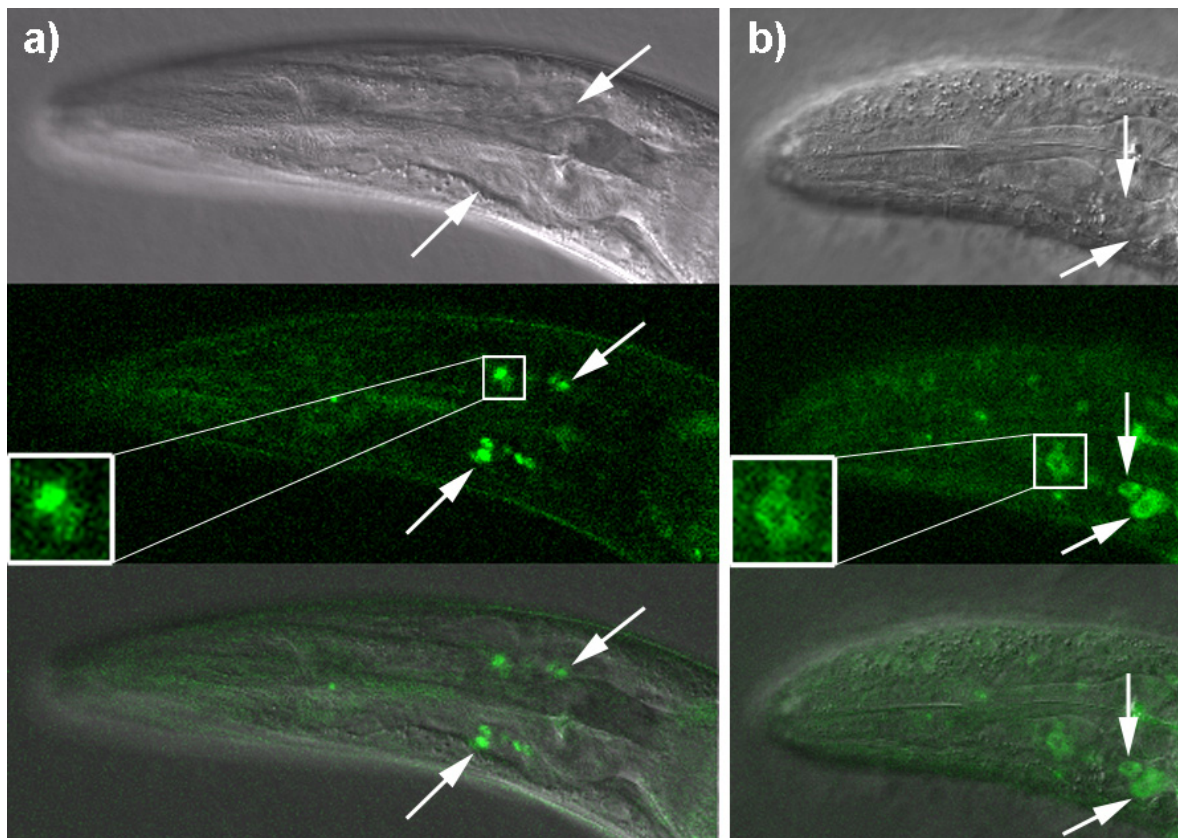


Abbildung 32: Lokalisierung des PIE-1::GFP Fusionsproteins in den somatischen Neuronen in der *smo-1* (*ok359*) Mutante. **a)** Das PIE-1::GFP Protein liegt im Wildtyp kernlokalisiert vor (Pfeile und Bildausschnitt). **b)** In der *smo-1* (*ok359*) Mutante ist das PIE-1::GFP Protein nicht im Kern, sondern im Cytoplasma lokalisiert (Pfeile und Bildausschnitt). In den beiden Vergrößerungen einzelner Neuronen ist der Unterschied gut zu sehen. Aufgrund der Kopplung der *smo-1* Mutation an den sichtbaren Marker *dpy-5* ist der Hermaphrodit in b) kürzer, und damit auch der dargestellte Kopfbereich.

Wie in den Keimbahnvorläuferzellen der Embryonen oder den frühen Oozyten ist auch in diesen Zellen die Lokalisierung des PIE-1 Proteins in den Zellkernen von der SUMOylierung des Proteins abhängig. Die cytoplasmatische Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in der Deletionsmutante *smo-1* im Gegensatz zur Kernlokalisierung im Wildtyp zeigt deutlich den Einfluss der posttranslationalen Modifikation durch SUMO. Wird das PIE-1 Protein SUMOyliert kommt es zur Kernlokalisierung. Im Gegensatz dazu verbleibt das nicht SUMOylierte PIE-1 im Cytoplasma.

Diskussion

Die Spezifizierung der Gründerzellen ist ein wichtiger Schritt in der Embryogenese von *C.elegans*. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher erst in Ansätzen verstanden. Die Analyse von neuen embryonalen Mutanten deckt fast immer neue Mechanismen und Regulationen der frühen Embryogenese auf. Auch in dieser Arbeit konnte ein Regulationsmechanismus entdeckt werden, der einen neuen Aspekt in der Spezifizierung der Gründerzellen darstellt.

In dieser Arbeit wurde die Mutante *ulp-1 (t1530)* („ubiquitin like protease“) analysiert. Das Gen kodiert für eine Protease, die zwei vorhergesagte Funktionen in dem posttranslationalen Modifizierungsweg der SUMOylierung hat. Zum einen wird das translatierte SUMO Protein durch Abspalten einer Aminosäure am C-terminus in die gereifte Form gebracht, in die das SUMO Protein an Zielproteine gebunden werden kann. Zum anderen hat das ULP-1 Protein die Funktion die Modifikation rückgängig zu machen, indem es die Peptidbindung zwischen SUMO und dem Zielprotein spaltet (Johnson, 2004; Melchior *et al.*, 2003). Für das Protein ULP-1 konnte die zweite Funktion *in vitro* und die Spezifität bezüglich des SUMO Proteins nachgewiesen werden.

Die phänotypische Charakterisierung der *ulp-1 (t1530)* Mutante zeigt Defekte in apoptotischen Zellen und in der Spezifizierung der MS Zelle. Die Defekte in der AB Zelllinie können auf eine partielle Induktion der betroffenen Zellen durch die MS Blastomere zurückgeführt werden. Die Pleiotropie in der Mutante ist wegen der Vielzahl an regulierten Proteinen und Prozessen durch die SUMOylierung zu erklären. Die Mutante *ulp-1 (t1530)* weist jedoch überraschend wenige Pleiotropien auf, obwohl die Liste an Proteinen, die von SUMO reguliert werden, ständig wächst (Schätzungen basierend auf Proteomics-Studien in Hefe 150 Proteine (Marx, 2005)). Eigentlich sollte man viele pleiotrope Funktionen erwarten, was sich zum Beispiel an der Vulva-Entwicklung in *C.elegans* zeigt. Zwei Proteine (LIN-1 und LIN-11) konnten identifiziert werden, die während der Vulva-Entwicklung durch SUMO reguliert werden (Broday *et al.*, 2004; Leight *et al.*, 2005).

Die einfachsten Erklärungen könnten die hypomorphe Eigenschaft des Allels *t1530* oder redundante Funktionen mit vier weiteren Ubiquitin ähnlichen Proteasen (*ulp-2* bis *ulp-5*) des *C.elegans* Genoms sein.

Das eine vollständige Deletion des SUMO Gens in *C.elegans* nur zu erstaunlich wenigen postembryonalen Defekten (offensichtlich ist nur die Sterilität und eine Missbildung der Vulva) führt, kann mit einer möglicherweise massiven maternalen Weitergabe des Proteins bzw. der mRNA begründet werden. Wie gezeigt führt eine posttranskriptionelle Inaktivierung (RNAi) des Gens zu embryonaler Letalität. Die vollständige Analyse der Funktionen von SUMO in der Embryonalentwicklung gestaltet sich durch die maternale Weitergabe des *smo-1* Genprodukts schwierig. Eine Restfunktion kann in den RNAi Experimenten nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Arbeit an der maternal letalen Mutante *ulp-1 (t1530)* konnten jedoch Aspekte der SUMOylierung während der Embryonalentwicklung von *C.elegans* analysiert werden.

SUMO und Apoptose

Regulation der Phagozytose oder der Apoptose?

Vergleicht man die apoptotischen Zellen der *ulp-1* Mutante mit den normalen, so wird deutlich, dass mehrere Prozesse gestört sind, wobei nicht offensichtlich ist, welche Phänomene direkt oder indirekt sind.

Betrachtet man ausschließlich den Phagozytosedefekt könnte der Schluss gezogen werden, dass die Regulation eines oder mehrerer Proteine durch SUMOylierung bzw. DeSUMOylierung für diesen Prozess essentiell sind. Wird nicht nur dieser Defekt in den apoptotischen Zellen betrachtet, sondern zusätzlich die veränderte Morphologie der Zellen, wie die Größe und das Nichterreichen des Linsen Stadiums, kann der Phagozytosedefekt indirekt dadurch verursacht sein, dass das Apoptoseprogramm nicht vollständig ausgeführt wird. Wenn die Zelle zwar noch „stirbt“, aber dennoch nicht alle unterliegenden Programme, z.B. die Präsentation der Phagozytosesignale auf der Zelloberfläche, ausgeführt werden, kann dies die primäre Ursache des Defekts in der Phagozytose sein.

Keine der bekannten Mutanten in den Genen *ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-10*, *ced-12*, die die Phagozytose der apoptotischen Zellen in *C.elegans* regulieren, zeigen die für *ulp-1* (*t1530*) charakteristischen morphologischen Abnormalitäten (eigene Beobachtungen und persönliche Mitteilung J. Cabello). Diese Mutanten phagozytieren die morphologisch „normalen“ Zelleichen nicht. Schwache Allele des Gens *ced-3* (Caspase) zeigen dagegen auch morphologische Unterschiede in den Zelltoden. In diesen Mutanten werden einige Zelltode vor dem Erreichen des Linsen Stadiums phagozytiert, andere zeigen nur die ersten Anzeichen einer apoptotischen Zelle und revertieren diese Veränderung in der Morphologie anschließend wieder (Hoepfner *et al.*, 2001). In der *ulp-1* (*t1530*) Mutante werden ebenfalls Zelltode vor dem Erreichen des Linsen Stadiums phagozytiert. Die Caspase *ced-3* reguliert unterliegende Prozesse wie die Degradation der DNA, die Kondensierung des Chromatins oder das typische „membrane-blebbing“.

Die Frage, ob die SUMOylierung die Apoptose oder die Phagozytose der apoptotischen Zellen reguliert, kann nicht beantwortet werden.

Die nicht phagozytierten Zellen erreichen nicht das Linsen Stadium und Zellreste werden phagozytiert ohne das Linsen Stadium aufzuweisen. Eine Erklärungsmöglichkeit liegt in einem unvollständig ablaufenden genetischen Programm in den apoptotischen Zellen. Die veränderten Abläufe während der Phagozytose in schwachen Allelen des Gens *ced-3* geben einen Hinweis auf mögliche durch SUMO regulierte Prozesse (siehe unten).

Wenn die Hypothese richtig ist, dass SUMO die Caspase *ced-3* beeinflusst, dann müssten Zellen, obwohl sie das Schicksal haben zu sterben, die Apoptose nicht ausführen. In starken *ced-3* Allelen findet fast keine Apoptose mehr statt. In schwachen Allelen des Gens hingegen sterben nur wenige Zellen nicht (z.B. 6 von 36 Zellen (16,7%) (Hoepfner *et al.*, 2001)). In der *ulp-1* Mutante ist die Analyse in Bezug auf nicht sterbende Zellen, die aber das Schicksal „Apoptose“ haben, nicht möglich, da die Schicksale der frühen Blastomeren verändert sein können. Es konnten Zellen identifiziert werden, die an der Position in der Zelllinie im Wildtyp sterben würden, die sich in der Mutante aber teilen. Diese Zellen können aber

nicht in Bezug auf die Apoptose ausgewertet werden, da nicht auszuschließen ist, dass die Zellen nicht das „Apoptose“ Schicksal besitzen.

Der Phänotyp ist sogar damit zu vereinbaren, dass beide Prozesse (Phagozytose und Apoptose) durch die SUMOylierung reguliert werden.

SUMO als Antagonist zu Ubiquitin in der Apoptose?

Nur Embryonen aus RNAi Experimenten für das Gen *zif-1* zeigen Zelltode mit einer vergleichbaren Morphologie zu den apoptotischen Zellen in den Embryonen, in denen die SUMOylierung beeinträchtigt ist. Das Protein ZIF-1 hat eine Funktion in der ubiquitinabhängigen Degradation von Proteinen, wie zum Beispiel verschiedener Zinkfinger Proteine in den somatischen Zellen des frühen Embryos (DeRenzo *et al.*, 2003). Eine Hypothese für weitere Arbeiten ist, dass der SUMOylierungsweg in den apoptotischen Zellen antagonistisch gegenüber der ubiquitinabhängigen Degradation wirkt. Denkbar wäre, dass ein oder mehrere Proteine an dem gleichen Lysinrest sowohl SUMOyliert, als auch (poly-) ubiquitiniert werden. Eine solche Schutzfunktion des SUMO Proteins vor dem Abbau der Akzeptorproteine wurde schon für andere Proteine gezeigt (Desterro *et al.*, 1998; Johnson, 2004; Lin *et al.*, 2003a; Melchior, 2000).

Der programmierte Zelltod wird durch Ubiquitin in vielfältiger Weise reguliert (Jessenberger und Jentsch, 2002). Die ersten Hinweise auf eine Verbindung des Ubiquitin signalweges und dem programmierten Zelltod stammen aus Untersuchungen an dem Tabakschwärmer (*Manduca sexta*), wo die Expression des Ubiquitins stark ansteigt bevor morphologische Veränderungen der Apoptose sichtbar werden (Wojcik, 2002). Ubiquitin beeinflusst den programmierten Zelltod sowohl positiv als auch negativ, es ist pro-apoptotisch und anti-apoptotisch zugleich. Zu den durch Ubiquitin regulierten Proteinen, die für die Apoptose wichtig sind, gehören neben anderen p53, Fas/CD95, IAP, I κ B α und Bcl-2 (Jessenberger und Jentsch, 2002). Der gegensätzliche Einfluss des Ubiquitins lässt sich am Beispiel der IAP's („Inhibitor of apoptosis“) verdeutlichen. Verschiedene IAP's können Initiator- und Effektorcaspasen blockieren, indem sie aktivierte Caspasen binden (Deveraux *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997). Neben den typischen BIR Domänen beinhalten viele IAP Proteine zusätzlich Motive, die funktionell mit

dem Ubiquitinsignalweg verbunden sind. Meist sind dies „RING-finger“ Domänen, die eine E3-Ligase Aktivität besitzen. Neben der Ubiquitinierung eines Zielproteins kann es auch zur Ubiquitinierung des „Ring-finger“ enthaltenen Proteins selbst kommen. Für IAP's ist nachgewiesen, dass es zu einer Autoubiquitinierung kommt (Yang *et al.*, 2000). Zusätzlich zur Autoubiquitinierung kommt es zur Ubiquitinierung von Caspasen (Huang *et al.*, 2000). Die Ubiquitinierung des Proteins selbst und die Ubiquitinierung der Caspasen führt dann zum Abbau der Proteine, wodurch eine positive bzw. negative Regulation der Apoptose möglich ist, je nachdem welches Substrat ubiquitiniert wird.

Die Funktion der homologen IAP's in *C.elegans* (*bir-1* und *bir-2*) während der Apoptose konnten bisher nicht untersucht werden, da die Proteine pleiotrope Funktionen aufweisen und es zu Cytokinese Defekten in frühen Embryonen kommt (Fraser *et al.*, 1999).

Auch für andere Proteine des programmierten Zelltodes konnte in *C.elegans* bisher keine Regulation durch Ubiquitinierung nachgewiesen werden. Es wäre dennoch denkbar, dass hier vergleichbare Regulationen durch Ubiquitin stattfinden, da der Apoptosesignalweg hoch konserviert ist. Die SUMOylierung könnte dann als Schutz vor der ubiquitinabhängigen Degradation fungieren.

SUMOylierung - DeSUMOylierung, gleicher Effekt?

Die Phänotypen in den apoptotischen Zellen der *ulp-1* (*t1530*) Mutante und den Embryonen aus den RNAi Experimenten für die Gene *smo-1* und *ubc-9* sind nahezu identisch. Die Funktionen der einzelnen Proteine sind jedoch gegensätzlich. SMO-1 (SUMO) und UBC-9 (E2-Ligase) sind für die SUMOylierung wichtig. ULP-1 besitzt DeSUMOylierungsaktivität, die für die Reversion der Modifikation wichtig ist.

Dass der gleiche Phänotyp in allen drei Fällen auftritt, kann verschiedene Gründe haben. Eine einfache Erklärung ist, dass das Protein ULP-1 benötigt wird um reifes SUMO bereitzustellen. Bei dieser Hypothese müsste allerdings vorausgesetzt werden, dass keines der weiteren vier Ubiquitin ähnlichen Proteasen (*ulp-2* bis *ulp-5*, siehe www.wormbase.org) im Embryo exprimiert wird bzw. die Funktion der Reifung des SUMO Proteins übernimmt. Ein anderer

Erklärungsansatz ist, dass die Aktivität des ULP-1 Proteins abhängig von einer SUMOylierung ist. Für ein menschliches Homolog (SENP1) konnte eine SUMOylierung nachgewiesen werden. Die Auswirkungen der SUMOylierung konnten hier aber nicht aufgezeigt werden (Bailey und O'Hare, 2004).

Für andere Phänotypen konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden, wenn ein ligierendes Protein oder ein deSUMOylierendes Protein ausgeschaltet wurde (persönliche Mitteilung F. Melchior).

Ausblick: Zielprotein mit Funktion in der Apoptose?

Die Zielproteine der SUMOylierung bei der Apoptose zu identifizieren, ist ein schwieriges Problem, das in dieser Arbeit nicht adressiert werden konnte, da zunächst der Phänotyp der apoptotischen Zellen in *ulp-1 (t1530)* Embryonen beschrieben werden musste. Die mögliche antagonistische Funktion der SUMOylierung zur ubiquitinabhängigen Degradation konnte aufgezeigt werden. Die Wirkung der SUMOylierung in der Apoptose ist nicht nur von Grundlageninteresse, sondern auch von großer medizinischer Relevanz. Je genauer die verschiedenen Regulationen der Prozesse während des programmierten Zelltodes verstanden werden, desto besser kann man diese Prozesse auch beeinflussen.

Der moderne (und kostenintensive) Ansatz die Zielproteine der SUMOylierung während der Apoptose oder der Phagozytose zu finden ist ein umfangreicher „Proteomics“-Ansatz. In einem solchen Ansatz werden alle SUMOylierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen immunpräzipitiert und anschließend mit Massenspektrometrischen Methoden (HPLC/MS/MS) analysiert. Diese Art der SUMO-Proteomics Ansätze werden zurzeit für verschiedene Organismen durchgeführt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Machbarkeit eines solchen Ansatzes nachweisen (Hannich *et al.*, 2004; Panse *et al.*, 2004; Vertegaal *et al.*, 2004; Wohlschlegel *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004b). Offen bleibt, ob in einem solchen Ansatz ein Großteil der SUMOylierten Proteine identifiziert werden kann. Die hohe Dynamik und das Verhältnis der modifizierten zur unmodifizierten Form bereiten für diese Methode zur Identifizierung eines Zielproteins Probleme.

C.elegans ermöglicht alternativ einen wenig aufwendigen (und preiswerten) genetischen Ansatz. Suppressoren und damit potentielle Zielproteine der

SUMOylierung während der Apoptose könnten nach einer Mutagenese der *ulp-1* (*t1530*) Embryonen der F3 Generation identifiziert werden, indem nach der Abwesenheit oder sehr starke Reduzierung nicht phagozytierter Zelleichen gesucht wird. Dies ist in wenigen Wochen möglich. Diese Mutantenlese würde sehr wahrscheinlich auch zur Identifizierung auch anderer, genereller Komponenten der SUMOylierung während der Apoptose führen.

Keimbahnentwicklung

Sterilität in der *smo-1* Deletionsmutante

Bevor ich mich der Funktion von PIE-1 in der frühen Embryogenese zuwende, möchte ich einen anderen interessanten Aspekt des Gens *pie-1* diskutieren.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine generelle Expression des PIE-1 Proteins in der Gonade beobachtet werden. Bisherige Veröffentlichungen behandeln nur die keimbahnspezifische Repression der Transkription in frühen Embryonen (Seydoux und Strome, 1999). Die Expression in der Keimbahn der Hermaphroditen könnte zunächst alleine für die maternale Versorgung mit dem Protein wichtig sein. Eine interessante Frage ist, ob das PIE-1 Protein eine Funktion in den reifenden Oozyten besitzt. Die bisher bekannten *pie-1* Mutanten sind alle maternal embryonal letal, allerdings sind sie auch bei den Mutantenlesen daraufhin selektiert worden. Trotzdem treten in einem dieser Stämme (*zu154*) gelegentlich sterile Hermaphroditen auf (eigene Beobachtungen und persönliche Mitteilung R.Schnabel). Diese Sterilität weist auf eine mögliche Funktion in der Keimbahn der adulten Tiere hin. Die bekannten *pie-1* Allele könnten eine Restfunktion haben. Die Untersuchung einer nachgewiesenen Nullmutante wäre im Hinblick auf die Keimbahnfunktion in den Hermaphroditen eine interessante Aufgabe.

Die Deletionsmutante von SUMO, *smo-1* (*ok359*), ist zu 100% steril (Broday *et al.*, 2004) und dies machte die Arbeit am frühen Embryo in der Mutante unmöglich. Der Grund für die Sterilität ist bisher unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins von SUMO abhängig ist. Eine interessante Frage ist nun, ob die Sterilität der *smo-1* (*ok359*) Mutante durch

die Misslokalisierung des PIE-1 Proteins verursacht wird, was, wie unten diskutiert, die Ursache der Störung des Schicksals von den Gründerzellen in den Embryonen ist. PIE-1 ist ein bifunktionelles Protein, das im Zellkern Transkription reprimiert und im Cytoplasma die Translation bestimmter mRNAs verstärkt (Tenenhaus *et al.*, 2001). In der *smo-1 (ok359)* Mutante sollte das PIE-1 Protein wie in den somatischen Neuronen cytoplasmatisch lokalisiert sein (siehe unten) und deshalb nur eine Funktion im Cytoplasma ausüben. Wenn nun die Transkription im Zellkern der Keimbahnzellen in der Gonade nicht unterdrückt würde und die Translation der mRNAs im Cytoplasma noch verstärkt ist, ließe sich die Sterilität in der *smo-1 (ok359)* Mutante leicht erklären.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Sterilität durch die Misslokalisierung von PIE-1 hervorgerufen wird, kann getestet werden, indem ein grundsätzlich kernlokalisiertes PIE-1 Protein in der *smo-1* Mutante exprimiert wird. Da die Kernlokalisierung abhängig von der SUMOylierung ist, kann dazu ein stabiles Fusionsprotein aus SUMO und PIE-1 in der *smo-1* Mutante exprimiert werden. Eine Rettung der Sterilität der *smo-1* Mutante würde die Richtigkeit der Hypothese unterstützen. Eine stabile Fusion aus SUMO und PIE-1 kann erreicht werden, indem die Aminosäuren (C-terminales Glycin-Glycin Motiv) des SUMO Proteins deletiert werden, die für die DeSUMOylierung essentiell und die Leserahmen der beiden Gene fusioniert werden. Zur Kontrolle kann eine Fusion mit dem Glycin-Glycin Motiv exprimiert werden. Für die Proteine LIN-11, SP3 und huntingtin konnte eine Fusion mit SUMO, den Einfluss der SUMOylierung für diese Substrate wieder herstellen (Broday *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2002; Steffan *et al.*, 2004). Ich habe entsprechende Konstrukte angefertigt, konnte die entsprechenden hochinteressanten Experimente aber wegen der scharfen zeitlichen Beschränkung des Graduiertenkollegs nicht mehr durchführen.

Spezifizierung der frühen Blastomeren

Regulation des PIE-1 Proteins durch SUMOylierung

In dieser Arbeit konnte das Zinkfinger Protein PIE-1 als ein Zielprotein der SUMOylierung identifiziert werden. Das Protein PIE-1 wird über verschiedene Mechanismen während der Reifung der Oozyten und der frühen Embryogenese reguliert. Für das PIE-1 Protein konnten bisher zwei verschiedene Funktionen nachgewiesen werden. Zum einen unterdrückt es die Genexpression in den Keimbahnvorläuferzellen des frühen Embryos, indem es direkt oder indirekt die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II verhindert (Kurosu *et al.*, 2004; Seydoux und Dunn, 1997; Seydoux *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003). Zum anderen verstärkt PIE-1 im Cytoplasma die Translation bestimmter mRNAs (z.B. *nos-2*) (Leatherman und Jongens, 2003; Seydoux und Strome, 1999; Tenenhaus *et al.*, 2001). Beide Funktionen sind für die Embryogenese bzw. für die Entwicklung der Keimbahn essentiell.

Die Aktivität von PIE-1 wird auf Proteinebene durch verschiedene Mechanismen reguliert. Eine asymmetrische Aufteilung bei jeder Teilung der Keimbahnvorläuferzellen stellt sicher, dass der größte Anteil des Proteins in die nachfolgende Keimbahnzelle und nicht in die somatische Tochterzelle gelangt (Mello *et al.*, 1996). Diese Aufteilung ist von dem Aktin Zytoskelett (sensitiv zu Cytochalasin D) und dem C-terminalen Ende des PIE-1 Proteins abhängig. Dafür ist der zweite Zinkfinger essentiell (Reese *et al.*, 2000). Nach jeder Zellteilung wird der geringe Anteil des Proteins, der in der somatischen Tochterzelle zurückbleibt, durch einen ubiquitinabhängigen Mechanismus abgebaut (DeRenzo *et al.*, 2003). Für die Degradation des Proteins ist der erste Zinkfinger essentiell (Reese *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit habe ich einen weiteren Regulationsmechanismus für das PIE-1 Protein identifizieren können. Die subzelluläre Lokalisierung des Proteins ist abhängig von einer posttranslationalen Modifizierung, der SUMOylierung. Die SUMOylierung des Proteins bewirkt die Lokalisierung des Proteins in den Zellkern.

Die Analysen der PIE-1::GFP Lokalisierung in der *ulp-1 (t1530)* Mutante zeigen, dass das PIE-1 Protein in den Zellkernen der somatischen Blastomeren lokalisiert ist. Da das Gen *ulp-1*, wie auch hier biochemisch gezeigt, für eine DeSUMOylierungsfunktion kodiert, ist es wahrscheinlich, dass der „Transport“ aus dem Kern von einer DeSUMOylierung abhängig ist. Dieses erklärt auch die „Fehllokalisation“ von PIE-1 in den somatischen Kernen der *ulp-1 (t1530)* Mutante. Das PIE-1 Protein liegt auch in den somatischen Zellen SUMOyliert vor und wird deshalb in den Zellkern transportiert bzw. im Kern zurückgehalten. Zwischen einem aktiven Transport in den Zellkern oder dem Zurückhalten des PIE-1 Proteins durch SUMOylierung im Kern kann derzeit nicht unterschieden werden. Für das Zurückhalten des Proteins im Kern spricht zum einen die Größe (38 kDa) und zum anderen das Fehlen einer Kernlokalisierungssequenz (NLS - „nuclear localisation site“). Es ist denkbar, dass das Protein frei zwischen Kern und Cytoplasma wechseln kann, es jedoch in der SUMOylierten Form zurückgehalten wird. Da der Anteil an SUMOyliertem Protein in einer Zelle häufig sehr gering ist, könnte das PIE-1 Protein, das einmal SUMOyliert wurde, in einen Komplex mit anderen Proteinen im Kern gebunden werden und dadurch zurückgehalten werden. Dieses würde sich mit gängigen, aktuellen Modellen decken, die versuchen, die transiente, aber lang wirkende SUMOylierung zu erklären (Hay, 2005; Johnson, 2004).

Der entgegengesetzte Effekt konnte in der mutierten Form (K68A) des PIE-1::GFP Proteins beobachtet werden. In diesem Protein ist das potentielle Akzeptorlysin für die SUMOylierung durch ein Arginin ausgetauscht. Dieses Fusionsprotein weist eine veränderte Aufteilung zwischen Kern und Cytoplasma auf, das Gleichgewicht ist zugunsten des Cytoplasmas verschoben. Die schwache restliche Kernlokalisierung des Proteins kann durch die Anwesenheit des endogenen PIE-1 Proteins erklärt werden, das die SUMOylierungsstelle noch besitzt. Dieses setzt allerdings voraus, dass das endogene PIE-1 Protein die mutierte Form beeinflusst. Deshalb sollte das Verhalten des mutanten PIE-1::GFP K68A Proteins in einem für das endogene Protein mutanten Hintergrund untersucht werden. Leider brachten die Transformationen der *pie-1 (zu154)* Mutante keine stabilen Linien hervor. Dieses kann als ein Indiz genommen

werden, das die mutierte Form (ohne das endogene Protein) einen letalen Einfluss auf *C.elegans* hat. Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen transgen exprimiertem und endogenem PIE-1 Protein wurden ebenfalls in Experimenten anderer Arbeitsgruppen beobachtet (Reese *et al.*, 2000).

In der Deletionsmutante von SUMO, *smo-1 (ok359)*, kann die Lokalisierung des PIE-1 Proteins nicht in den Embryonen analysiert werden, da die homozygoten Hermaphroditen Sterilität aufweisen. Dieses Problem könnte in Zukunft eventuell mit Hilfe von maternalen Klonen gelöst werden. Die Lokalisierung des PIE-1::GFP Fusionsproteins wurde deshalb hier alternativ in den Neuronen analysiert.

Die Lokalisierung des PIE-1::GFP Proteins in den Neuronen der *smo-1 (ok359)* Mutante ist eindeutig cytoplasmatisch. Der Einfluss des endogenen Proteins entfällt, da in diesem Fall sowohl das endogene als auch das Fusionsprotein nicht SUMOyliert werden kann. Die Ergebnisse zeigen erneut den erwarteten gegensätzlichen Effekt im Vergleich zu der *ulp-1 (t1530)* Mutante.

Der Vergleich der Immunfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper gegen das PIE-1 Protein mit den PIE-1::GFP Expressionen im Wildtyp zeigt, dass der monoklonale Antikörper ausschließlich eine Subpopulation des Proteins erkennt. Das für die Immunisierung benutzte Peptid enthält die SUMOylierungsstelle, was wohl Zufall war und von Tenenhaus *et al.* (1998) nicht beschrieben wurde. Die Immunfärbungen detektiert nicht das kernlokalisierte Protein. Hier hat sich der spezifische Antikörper als wertvolles Werkzeug erwiesen. Der Antikörper kann als spezifisch für das nicht SUMOylierte PIE-1 angesehen werden. Die Immunfärbungen unterstützen die Ergebnisse der Abhängigkeit der SUMOylierung bezogen auf die Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins.

PIE-1 in der *ulp-1 (t1530)* Mutante

Die Identifizierung des PIE-1 Proteins als Substrat der SUMOylierung erfolgte durch ein Experiment, das eigentlich ein anderes Ziel verfolgte. Der Ausgang des Experiments kann daher retrospektiv als glücklich bezeichnet werden. Die Suche nach Proteinen, die SUMOyliert werden, kann sehr mühsam sein wie oben beschrieben. Hier konnte durch ein „einfaches“ genetisches Experiment das PIE-1 Protein als Substrat der SUMOylierung gefunden werden.

Der Phänotyp der *ulp-1 (t1530)* Mutante gab zuerst keinen Hinweis auf eine Regulation des PIE-1 Proteins. Erst durch (Über-)Expression der reifen Variante des SMO-1 Proteins in der Mutante veränderte sich der Phänotyp, so dass eine Regulation des PIE-1 Proteins sichtbar wurde. Dann konnte nachgewiesen werden, dass die Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins direkt von der SUMOylierung abhängig ist.

Im Wildtyp ist das Protein nach der asymmetrischen Aufteilung in der somatischen Zelle nicht SUMOyliert und liegt nicht im Zellkern vor. In der Keimbahnzelle gelangt ein Teil des Proteins durch die SUMOylierung in den Zellkern und reprimiert das somatische Schicksal (Abbildung 33a).

In *pie-1* Mutanten ist kein bzw. wenig aktives Protein vorhanden. Die Keimbahnzellen zeigen ein vermischtes somatisches Schicksal, da die Transkription nicht unterdrückt wird (Abbildung 33b).

Eine asymmetrische Aufteilung des PIE-1 Proteins zwischen Keimbahn- und Somazelle ist auch in der *ulp-1 (t1530)* Mutante vorhanden, da diese nicht von SUMO abhängig ist. Anstatt im Cytoplasma vollständig abgebaut zu werden, ist wegen der mangelnden ULP-1 Aktivität PIE-1 noch SUMOyliert und kann deshalb in somatischen Kernen ebenfalls seine Aktivität entfalten, die Transkription wird reprimiert (Abbildung 33c). Als Konsequenz wird das normale somatische Schicksal nicht korrekt ausgeführt. Die nur „geringen“ Defekte in den somatischen Zellen der Mutante sind in der asymmetrischen Aufteilung des PIE-1 Proteins begründet. Die Transkription kann nicht, wie in den Keimbahnzellen, vollständig reprimiert werden. Die somatische Zelle führt deshalb ein verändertes Schicksal aus, wobei die Keimbahnzelle selbst nicht beeinflusst ist.

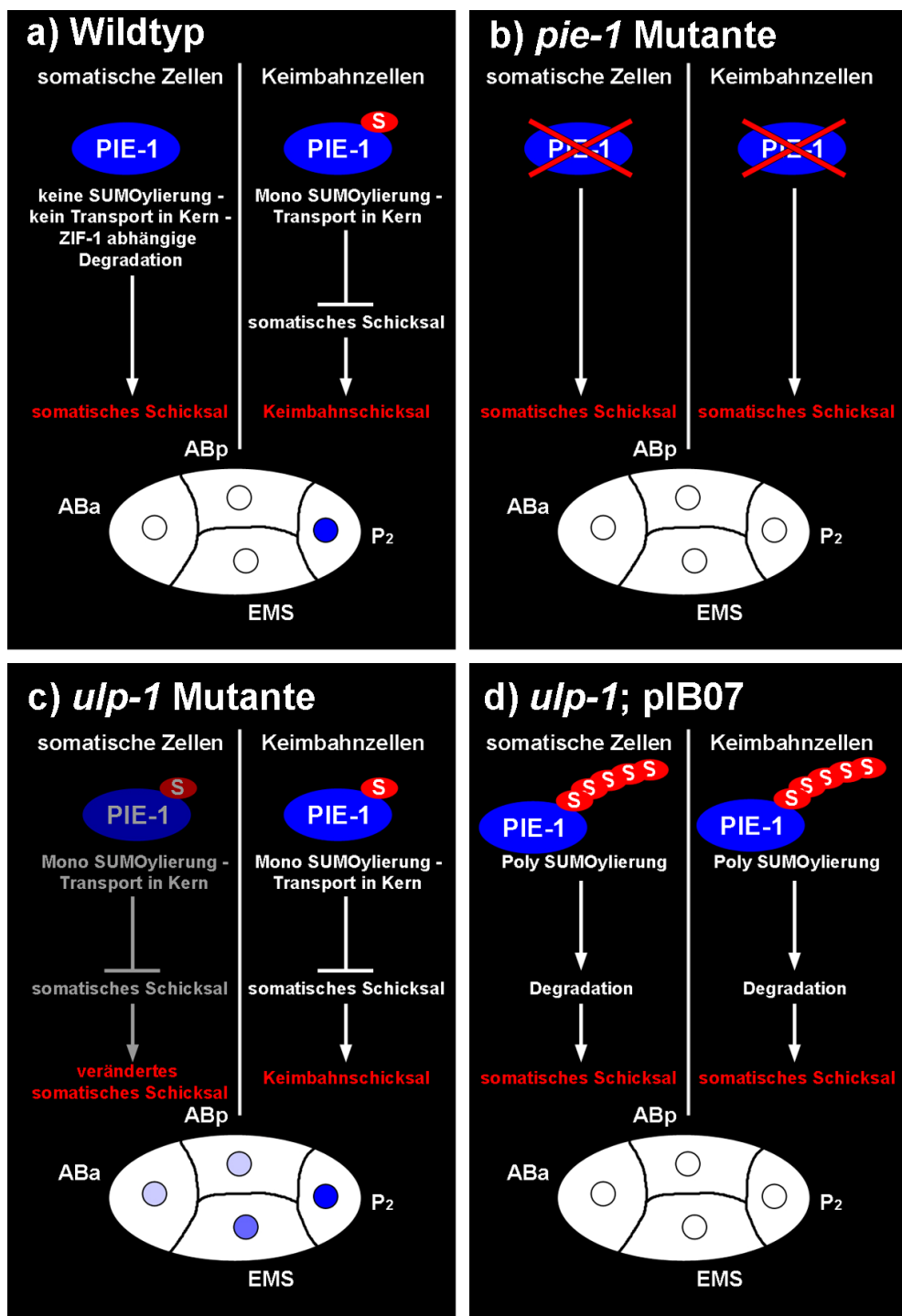


Abbildung 33: Erklärung der Lokalisierung bzw. der Degradation des PIE-1 Proteins in verschiedenen genetischen Hintergründen. **a)** Wildtyp. **b)** *pie-1* Mutante. **c)** *ulp-1* (*t1530*) **d)** *ulp-1* (*t1530*) Mutante in der reifes SMO-1 (über-)exprimiert wird. Erläuterungen siehe Text.

Wird in der *ulp-1* (*t1530*) Mutante reifes SUMO (*smo-1ΔF*), das nicht mehr prozessiert werden muss, (über-)exprimiert, zeigt die Mutante einen mit *pie-1* Mutanten vergleichbaren Phänotyp. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass es in diesem Fall nicht nur zu einer Mono-SUMOylierung, sondern zu einer Poly-SUMOylierung des PIE-1 Proteins kommt (Abbildung 33d). Durch diese Poly-SUMOylierung (analog einer Poly-Ubiquitinierung) kann es dann zum Abbau des PIE-1 Proteins durch das Proteasom kommen, so dass das SMO-1ΔF einen dominant negativen Effekt hat. Eine Poly-SUMOylierung eines Substrats ist unter Wildtypbedingungen ungewöhnlich. Eine Poly-SUMOylierung konnte aber *in vitro* (Johnson und Gupta, 2001; Tatham *et al.*, 2001) und *in vivo* durch Mutation einer Ubiquitin ähnlichen Protease in *S.cerevisiae* (Bylebyl *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Über die Auswirkungen einer Poly-SUMOylierung auf das modifizierte Protein kann nur spekuliert werden. Dies könnte das Protein einfach inaktivieren oder auch, wegen der strukturellen Ähnlichkeit von SUMO und Ubiquitin, dazu führen, dass das Protein durch das Proteasom abgebaut wird (Tatham *et al.*, 2001).

Erklärt die PIE-1 Misslokalisierung den *ulp-1* Phänotyp?

In der *ulp-1* Mutante sind, neben den Defekten in den apoptotischen Zellen, auch Pharynx- und Körpermuskelzellen betroffen. Die Probleme in der Spezifizierung der MS Blastomere werden hier mit der Kernlokalisierung des PIE-1 Proteins in den frühen somatischen Blastomeren erklärt. Die verringerte Anzahl der Pharynxmuskelzellen in der Mutante erklärt sich durch die Lokalisierung des PIE-1 Proteins in dem Zellkern der EMS Blastomere. In dieser Blastomere kommt es zur teilweisen Unterdrückung der Genexpression und somit zu einer fehlerhaften Schicksalsausprägung in der Tochterzelle MS. Das hybride Schicksal in der Zelllinie ABalp ist dann ein indirekter Defekt, der aufgrund einer partiellen Induktion ausgehend von der MS Blastomere zustande kommt. Die von Titus Kaletta aufgestellte Hypothese, dass MS defekt ist, war richtig (Kaletta, 1998).

Die verringerte Anzahl der Körpermuskelzellen ist zum einen auf den Defekt in der MS Blastomere zurückzuführen, aber zum anderen auch auf möglicherweise defekte Spezifizierungen der Blastomeren C und D, in denen ebenfalls das PIE-1

Protein die Genexpression reprimiert. Die reprimierende Wirkung des PIE-1 Proteins in somatischen Blastomeren konnte durch ektopische Expression des *pie-1* Gens in frühen Embryonen nachgewiesen werden (Seydoux *et al.*, 1996).

Zusammenfassend bewirkt die reduzierte DeSUMOylierung-Aktivität in der *ulp-1 (t1530)* Mutante eine Misslokalisierung des PIE-1 Proteins. Die defekten Spezifizierungen der frühen Blastomeren in der *ulp-1 (t1530)* Mutante ist in dieser Misslokalisierung begründet. Interessanterweise handelt es sich damit um einen neomorphen Effekt des PIE-1 Proteins. Der Phänotyp in den apoptotischen Zellen ist sehr wahrscheinlich nicht durch die Regulation des PIE-1 Proteins zu erklären, da in allen bekannten *pie-1* Mutanten kein Defekt in diesen Zellen auftritt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass weitere Proteine durch ULP-1 in der Embryogenese von *C.elegans* reguliert werden. Das Allel *t1530* ist hypomorph und besitzt damit Restaktivität. Eine späte embryonale bzw. postembryonale Funktion des Gens konnte nicht aufgezeigt werden. Um nur annähernd alle Funktionen eines solch pleiotropen Gens zu analysieren, müsste ein temperatursensitives Allel zur Verfügung stehen. Zhang *et al.* (2004) konnte eine mögliche Funktion in der späten Embryogenese zeigen. Die subnukleäre Lokalisierung des „Polycomb group“ Proteins SOP-2 verändert sich, wenn die Ubiquitin ähnliche Protease (ULP-1) coexprimiert wird (Zhang *et al.*, 2004). Ungeklärt bleibt, ob die DeSUMOylierung von SOP-2 im Wildtyp von ULP-1 oder aber einer anderen Ubiquitin ähnlichen Protease übernommen wird.

Weitere Allele des Gens *ulp-1* könnten weitere Funktionen aufdecken. Die *ulp-1 (t1530)* Mutante stellt keine Nullmutante dar. Der Phänotyp einer Nullmutante würde sicher im Hinblick auf weitere Funktionen hilfreich sein. Ideal wäre aber eine konditionale (Null-)Mutante, mit der pleiotrope Funktionen analysiert werden können.

Ein Deletionsallel (*tm1174*) des Gens *ulp-1* wurde in Japan isoliert (National Bioresource Project). Wie ich gezeigt habe, ist das Allel *tm1174* ist allerdings homozygot lebensfähig und zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp. Die 872 bp große Deletion umfasst die ersten drei Exons des *ulp-1* Gens. Das vierte Exon enthält ein Startkodon in dem richtigen Leseraster. Die C-terminale Protease

Domäne ist nicht betroffen. Die N-terminale Region des Proteins besitzt also wahrscheinlich keine essentielle Funktion.

Die komplexe Embryogenese von *C.elegans*

Die phänotypische und molekulare Charakterisierung der *ulp-1* Mutante sind ein gutes Beispiel für die komplexe Regulation der frühen Embryogenese von *C.elegans*. Das PIE-1 Protein zeigt die Komplexität der Regulation auf Proteinebene. Die SUMOylierung bewirkt die Lokalisierung des Proteins in den Kern der Zellen. Die Degradation des PIE-1 Proteins ist wiederum abhängig von Ubiquitin. Die Regulation der asymmetrischen Aufteilung zwischen somatischer Blastomere und Keimbahnzelle ist bisher nur unvollständig verstanden. Mit dieser Arbeit wurde hoffentlich ein kleiner Beitrag zum Verständnis der frühen Embryogenese geleistet.

Die auch genetische Suche nach immer neuen Genen, die die Musterbildung von Organismen steuern, ist deshalb für das weitere Verständnis der Entwicklung unerlässlich.

Material und Methoden

Geräte

Die in dieser Arbeit benutzten Geräte sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Geräte	Hersteller
Agarosegelkammer	Gibco BRL
Blot Apparatur	BioRad
Elektrophorese Apparatur	BioRad
Elektroporator	BioRad
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan2	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Biokular MZIII Fluor	Leica
Glasnadelziehgerät	FMI GmbH
Heizblock	Techne
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Laser Scanning Mikroskop (LSM 510)	Zeiss
Lichtmikroskope Biokular	Wild, Leica
Pipetten P2, P10, P20, P200, P1000, P5000	Gilson
Pipetierhilfe	Hirschmann
pH-Meter	Knick
Rollmischer	Karl Hecht KG
Rotoren (GSA, SS34)	Sorvall
Sequenzierer	Applied Biosystems
Spannungsquellen	BioRad u. Gibco BRL
Spektrometer	Pharmacia LKB
Tischzentrifuge	Eppendorf
Thermocycler	Eppendorf
Ultraschallbad	Bandelin
Ultraschallsonde	B. Braun Biotech
Videokameras für die Mikroskopie	Hamamatsu
Wasserbad	Julabo

Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Diagonal, Roth und Sigma bezogen und für die angegebenen Lösungen benutzt.

Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Ligasen, Restriktionsendonukleasen und DNA Polymerasen von den Firmen Gibco BRL, Invitrogen, MBI Fermentas GmbH und Stratagene bezogen.

Kits

In dieser Arbeit wurden die folgenden Kits verwendet:

Kit	Hersteller
Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep®8 Miniprep Kit	Qiagen
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System SP6, T7 oder T3	Promega
MEGAscript® SP6, T7 oder T3	Ambion
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning pCR4	Invitrogen
TOPO BluntEnd Cloning pCR4	Invitrogen
Genomic DNA Kit G20	Qiagen
Genomic DNA Buffer Set	Qiagen
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen

Cosmide und Yeast Artificial Chromosomes (YACs)

Die in dieser Arbeit benutzten Cosmide und YACs wurden vom Sanger Center, Hinxton Hall, Cambridge von Dr. A. Coulson bezogen. Die Cosmide wurden für Komplementierungsexperimente oder als Matrize zur Amplifikation von Genen benutzt. Die YACs wurden über homologe Rekombination (siehe unten) verändert und dann für Transformationsexperimente isoliert.

Cosmide: T10F2, K12C11, F54D8, F21H11, K10D2,

YACs: Y97D10, Y51F8

Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die folgenden *Escherichia coli* Sicherheitsstämme verwendet.

Stamm	Genotyp
DH5α	F ⁻ supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
BL21	F ⁻ dcm ompT hsdS (r _B -m _B -) gal

C. elegans Stämme

Alle *C.elegans* Stämme wurden entweder vom „*C.elegans* Genetic Center“ (CGC) an der Universität von Minnesota (USA) oder von den Laboren, in denen die Stämme generiert wurden (siehe unten), bezogen. Als Wildtypstamm wird der in Bristol isolierte N2 Stamm verwendet.

Genotyp	Referenz
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; him-3(e1147)</i>	diese Arbeit
<i>ulp-1 (t1530) lon-1(e185) / qC1</i>	diese Arbeit
<i>unc-32 (e189) sDf121 / qC1</i>	CGC
<i>smo-1(ok359)/szT1; +szT1</i>	CGC
<i>smo-1(ok359)/hT2; +hT2</i>	diese Arbeit
<i>smo-1(ok359) dpy-5 (e61)/hT2; +hT2</i>	diese Arbeit
<i>pha-1(e2123)</i>	(Granato <i>et al.</i> , 1994)
<i>ulp-1 (tm1174)</i>	Nat. Bioresource Project, Japan
<i>pie-1(zu154) unc-25(e156)/qC1</i>	CGC
<i>axEx73 (pJH3.92; PIE-1::GFP)</i>	(Reese <i>et al.</i> , 2000)
<i>smo-1(ok359) dpy-5 (e61)/hT2; +hT2; axEx73</i>	diese Arbeit
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; axEx73</i>	diese Arbeit
<i>ulp-1 (t1530) lon-1(e185) / qC1; axEx73</i>	diese Arbeit
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; pIB01 (gen.ulp-1)</i>	diese Arbeit
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; pIB02 (ulp-1::GFP)</i>	diese Arbeit
<i>ulp-1 (t1530) lon-1(e185) / qC1; pIB02 (ulp-1::GFP)</i>	diese Arbeit
<i>pIB02 (ulp-1::GFP)</i>	diese Arbeit
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; pIB03 (YAC ulp-1::GFP)</i>	diese Arbeit
<i>pha-1(e2123); pIB03 (YAC ulp-1::GFP)</i>	diese Arbeit
<i>pha-1(e2123); pIB05 (GFP::smo-1)</i>	diese Arbeit
<i>unc-32(e189) ulp-1(t1530)/qC1; pIB07 (smo-1 delta F)</i>	diese Arbeit
<i>pha-1(e2123); pIB07 (smo-1 delta F)</i>	diese Arbeit
<i>pha-1(e2123); pIB08 (PIE-1::GFP K68A)</i>	diese Arbeit

Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma MWG Biotech AG bezogen. Eine Liste der Primer sowie deren Verwendungszweck ist im Anhang zu finden.

Lösungen

APS (10% Gebrauchslösung)

10 % (w/v) APS

dNTP-Mix (je 2mM)

2 mM dATP

2 mM dCTP

2 mM dGTP

2 mM dTTP

Einfriermix

50 ml M9

50 ml Einfrierpuffer

150 µl MgSO₄ Lsg. (0,1 M)

Einfrierpuffer

300 g Glycerin

5,8 g NaCl

6,8 g KH₂PO₄

560 µl NaOH (5 M)

ad 1000 ml dH₂O

Elektrodenpuffer (5x Stammlösung)

60 g Tris base

288 g Glycin

10 g SDS

ad 2000ml dH₂O

Hypochloritlösung

12 ml HOCl

5 ml KOH (5 M)

M9-Puffer

3,0 g KH₂PO₄

6,0 g Na₂HPO₄

5,0 g NaCl

1 ml 1 M MgSO₄ – Lösung

auf 1000 ml mit dest. H₂O auffüllen und autoklavieren

Mounting-Puffer

20 % 2[3]-t-Butyl-4-Hydroxyanisol

6 % n-Propyl-Gallat

4 % Na-Azid

in Propylenglycol (1,2-Propandiol; mehrere Stunden stark schütteln; maximal 1 ml Aliquots herstellen)

PBS Puffer

4 mM KH_2PO_4

16 mM Na_2HPO_4

115 mM NaCl

PBST Puffer

4 mM KH_2PO_4

16 mM Na_2HPO_4

115 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween-20

PFA-TBS

0,5 g Paraformaldehyd

0,5 ml H_2O

1 Tropfen NaOH (1 M)

Bei 80°C für 2-3 Minuten lösen

ad 10ml TBS

Proteinase K-Lösung

20 mg/ml in 10 mM Tris pH 7,5

20 mM CaCl_2

50 % Glycerol

bei -20°C aufbewahren;

Reaktionskonzentration: 50 µg/ml

Reaktionstemperatur: 37 bis 56°C

PVP

10 mg PVP (M=360, Sigma)

500 µl dd H_2O

99,5 ml Ethanol

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4 % SDS

SDS-Page Probenpuffer (2x)

20 % (v/v) Glycerin
4 % (w/v) SDS (20% (w/v))
125 mM Tris-HCl pH 6,8
10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

SDS-Sammelgel (4 %)

2,4 ml dH₂O
1,0 ml Sammelgelpuffer
40 μ l SDS (10 % (w/v))
0,5 ml Acrylamid / Bis-Acrylamid (30 % / 0,8 %; Verhältnis 37,5:1)
40 μ l TEMED (10 % (v/v))
200 μ l APS (10% (w/v))

SDS-Trenngel (12 %)

4,75 ml dH₂O
3,8 ml Trenngelpuffer
130 μ l SDS (10 % (w/v))
6 ml Acrylamid / Bis-Acrylamid (30 % / 0,8 %; Verhältnis 37,5:1)
60 μ l TEMED (10 % (v/v))
600 μ l APS (10 % (w/v))

„Single-Worm Lysis Buffer“

50 mM KCl
10 mM Tris-Cl, pH 8,3
2,5 mM MgCl₂
0,45 % (v/v) NP-40 oder Triton X-100
0,45 % (v/v) Tween 20

TAE-Puffer

25fach konzentrierte Lösung
121,1 g Tris base
28,6 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
mit dest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

TBE-Puffer

fünffach konzentrierte Stammlösung (pro Liter)
54 g Tris base
27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
auf 1000 ml mit dest. H₂O auffüllen
Konzentration für Agarosegele: 0,5fach TBE

TBS Puffer (10 x Stammlösung)

87,66 g NaCl
60,57 g Tris base
30 ml NaOH (2 M)
ad 1000 ml dH₂O, pH 7,4 einstellen

1xTE/1xLiAc

1 ml TE Puffer (10x)
1 ml LiAc (10x)
8 ml dH₂O

PEG/LiAc

1 ml TE Puffer (10x)
1 ml LiAc (10x)
8 ml PEG4000 (50 %)

Puffer W

100 mM Tris HCl pH8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris pH 8,0
1 mM EDTA

TEMED (10 % Gebrauchslösung)

10 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS

Tween®-TBS

0,05 % (v/v) Tween®-20
150 mM NaCl
50 mM Tris (HCl, pH 7,4)

Medien

Aminosäure Stammlösung (- Ura)

500mg Adenin
240 mg Arginin
1200 mg Asparaginsäure
1200 mg Glutaminsäure
240 mg Histidin
720 mg Leucin
360 mg Lysin
240 mg Methionin
600 mg Phenylalanin
4500 mg Serin
2400 mg Threonin
480 mg Tryptophan
180 mg Tyrosin
1800 mg Valin
ad 100 ml dH₂O, autoklavieren (115°C, 15 min)

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar (nur bei Platten)
ad 1000 ml dH₂O, pH 7,5 einstellen
Antibiotika werden nach dem Autoklavieren in den entsprechenden Konzentrationen (Amp 100 mg/l; Kan 50 mg/l) zugegeben.

SD-Medium

6,7 g Yeast Nitrogen base (w/o AA)
25 g Agar
8,3 ml Aminosäuremix (- Ura)
ad 900ml dH₂O, pH 5,8 einstellen
ad 950ml dH₂O, autoklavieren
+ 50 ml Glucose (40 %)
für Selektion G418 (Konzentration 200 mg/l) zugeben

SOB

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
15 g Agar (nur bei Platten)
10 ml KCl (0,25 M)
ad 1000 ml dH₂O, pH 7,0 einstellen

SOC

970 µl SOB
20 µl Glucose (1 M)
10 µl MgCl₂

YPD Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Bacto-Pepton
20 g Agar (für Platten)
ad 900 ml dH₂O, autoklavieren
100 ml 20% Glukosemonohydrat zugeben, separat autoklaviert

Kultivierung von *C. elegans*

Die *C. elegans* Stämme wurden unter den üblichen Bedingungen kultiviert (Brenner, 1974; Wood, 1988). Die Tiere wachsen auf NGM-Platten, die mit *E. coli* OP-50 beimpft sind. Die Tiere werden bei 15°C, 20°C oder 25°C inkubiert. Die Würmer werden mit einem ausgeglühten Platindraht unter sterilen Bedingungen von Platte zu Platte transferiert. Um eine größere Anzahl von Würmern zu transferieren, wird mit einem ausgeglühten Skalpell ein kleines Rechteck aus einer besiedelten Platte ausgeschnitten und kopfüber auf eine neue Platte gelegt.

Kreuzungen

Die Kreuzungen werden durchgeführt, indem vier L4 Hermaphroditen eines Stammes mit 10 bis 15 Männchen des anderen Stammes zusammen auf eine Platte gesetzt werden. Es wird eine entsprechende Anzahl von F1 und danach F2 Tieren vereinzelt und ihre Nachkommen analysiert.

4D-Mikroskopie

Die 4D-Mikroskopie bezeichnet eine 3-dimensionale Zeitrafferaufnahme eines Objekts (Schnabel *et al.*, 1997). Die Embryogenese des Wurms kann durch eine Aufnahme, bei der alle 35 Sekunden 25 Ebenen des Embryos aufgenommen werden, verfolgt und mit entsprechenden Programmen analysiert werden.

Die Embryonen werden für die 4D-Mikroskopie folgendermaßen präpariert: Der zu untersuchende Stamm (z.B. *unc-32 (e189) ulp-1 (t1530)/qC1*; *him-3*) wird bei 25°C inkubiert. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls bei 25°C durchgeführt. In

destilliertem Wasser werden homozygote Hermaphroditen mit einem Skalpell links und rechts von der Vulva aufgeschnitten. Dabei werden die Eier freigesetzt. Einzelne Eier, die in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (1- bis 4-Zellstadium) sind, werden mit einer Pipette auf einen Objektträger mit einem Agarpad (5 % Agar) überführt. Ein aufgelegtes Deckglas wird mit Vaseline versiegelt, wobei vorher noch ausreichend Wasser dazu gegeben wird, um ein Austrocknen der Embryonen zu vermeiden.

Die Embryonen werden mit dem 4D-Mikroskop unter Verwendung einer Nomarski-Optik untersucht (Axioplan 1 oder Axioplan 2, Fa. Zeiss, Plan-Neofluor 100x / 1,3 Öl, Zeiss). Die Bilder werden von einer Kamera (Fa. Hamamatsu) aufgenommen und digital auf Festplatten gespeichert. Eine Standardaufnahme dauert sechs bis acht Stunden, bei der alle 35 Sekunden 25 Ebenen des Embryos aufgenommen werden. Die Ebenen haben in der Regel einen Abstand von 1µm. Bei diesen Parametern ist die Auflösung einer Aufnahme ausreichend um alle Zellen, ihre Teilungen und Zellwanderungen zu verfolgen.

Um Bilder von Larven oder adulten Würmer zu machen, wurden die Nematoden mit Levamisol (Konzentration 1mM) auf einem Agarpad präpariert und die Temperierung des Mikroskoptisches auf 10°C eingestellt. Durch das Levamisol, einem Antagonisten von Acetylcholin, verbleiben die Muskeln in einem kontrahierten Zustand und die Würmer bewegen sich nicht mehr.

Analyse der Zelllinien

Die Analyse der aufgenommenen Embryonen erfolgt mit der Software SIMI°BioCell der Firma SIMI° (Schnabel *et al.*, 1997). Die zeitlichen und räumlichen Positionen aller Zellen und Mitosen eines untersuchten Embryos werden als Zellstammbaum dargestellt. Aus den Daten eines Embryos kann das Programm eine repräsentative 3D Darstellung des Embryonen generieren. Ein Vergleich mit einem Referenzembryo ermöglicht es unter anderem Aussagen über Schicksals-transformationen, Form und Lage von Zellen oder deren Nachkommen zu treffen.

Für zusätzliche Informationen zu diesem Programm siehe Handbuch (SIMI°BioCell Users Manual for Version 2.23).

Laser Scanning Mikroskop (LSM)

Für Berechnungen der Kern/Zytoplasma Verhältnisse der PIE-1::GFP Lokalisierung in den verschiedenen genetischen Hintergründen, sowie der mutierten Form des PIE-1::GFP Proteins wurden die Embryonen mit dem Laser Scanning Mikroskop (LSM 510) am Institut für Pflanzenbiologie von Prof. R. Mendel untersucht.

Die Embryonen und die adulten Hermaphroditen wurden für die Aufnahmen am LSM wie für die 4D-Aufnahmen bzw. die Mikroskopie von Hermaphroditen präpariert. Da das LSM nicht, wie die 4D Mikroskope über einen temperierten Mikroskoptisch verfügt, wurde während der Aufnahmen darauf geachtet, dass die Raumtemperatur ungefähr 25°C betrug.

Die Auswertungen der Bilder für die Berechnungen der Kern/Zytoplasma Verhältnisse wurden mit dem Programm „LSM Image Examiner“ (Zeiss) durchgeführt. Es wurde zunächst für jeden Embryo ein ungefähr 5µm² großer, runder Ausschnitt ausgewählt. Dieser Ausschnitt wurde dann wahllos in jeweils fünf verschiedene Bereiche des Kerns und des Zytoplasmas bewegt und die jeweiligen angezeigten, durchschnittlichen Pixelwerte des GFP-Kanals notiert. Die Pixelwerte bewegen sich immer zwischen 0 und 255, wobei 0 einem schwarzen und 255 einem weißen (bzw. grünen) Pixel entspricht. Aus diesen fünf Werten wurden dann nochmals Mittelwerte für den Kern bzw. für das Zytoplasma berechnet. Anschließend wird für jeden Embryo separat der durchschnittliche Wert für den Kern durch den Wert des Zytoplasmas geteilt. Aus allen analysierten Embryonen wird dann ein Durchschnittswert für das Verhältnis berechnet.

Die für die Auswertung betrachteten Pixelwerte entsprechen der Intensität des GFP Signals und stellen damit ein Maß für die Präsenz des PIE-1::GFP bzw. des PIE-1::GFP K68A Proteins dar. Da die Verhältnisse jeweils innerhalb eines Embryos berechnet wurden, sind Unterschiede in der Stärke der Expression (welche von Embryo zu Embryo verschieden sein können) zu vernachlässigen. Es wurden außerdem nur Embryonen ausgewertet, in denen die Pixelwerte nicht in den Grenzbereichen (z.B. 255) lagen, da dies einer Sättigung entsprechen würde und damit das Verhältnis nicht richtig wiedergeben würde.

Immunfluoreszenzfärbung

Bei dieser Methode werden Proteine spezifisch von einem Antikörper erkannt und dieser Antikörper mit einem sekundären Antikörper, der einen kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoff enthält, nachgewiesen.

Präparation der Embryonen (Aufbrechen der Eischale):

Es werden Embryonen wie unter „4D-Mikroskopie“ beschrieben präpariert. Die Embryonen werden auf eine mit Poly-L-Lysin (0,25 mg/ml) überzogene Aussparung eines Teflon-beschichteten Objektträgers transferiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Präparat wird mindestens 10 min. auf einem in Trockeneis liegenden Metallblock eingefroren. Das Deckgläschen wird anschließend schnell abgehoben, indem der Objektträger mit dem Objekt nach unten gedreht und das überstehende Deckgläschen mit einem Finger angetippt und damit entfernt wird.

Methanol-Aceton Fixierung:

Das Präparat wird zuerst 5 min. in -20°C kaltem Methanol und anschließend 5 min. in -20°C kaltem Aceton inkubiert.

Paraformaldehyd Fixierung:

Bevor die Präparate wie oben beschrieben aufgeschlossen werden, wird der Wassertropfen abgesaugt und gleichzeitig wird PFA auf die Embryonen gegeben. Das PFA wird wiederum abgesaugt und frisches PFA zu den Embryonen gegeben und 15 bis 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird mit der Methanol-Aceton Fixierung weitergearbeitet.

Antikörperfärbung:

Das Präparat wird 10 min. in Tween[®]-TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Teflonbeschichtung zwischen den Objekten wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer abgeschrägten gelben Pipettenspitze trockengesaugt. Pro Aussparung auf dem Objektträger werden ca. 10 μl Primärantikörper pipettiert. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer (große, feuchte Agarplatte), damit die Objekte nicht austrocknen. Es wird entweder eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Primärantikörper wird durch Inkubation für 10 min. in Tween[®]-TBS bei Raumtemperatur abgewaschen. Die überschüssige

Flüssigkeit wird wieder mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. 10 µl des Sekundärantikörpers werden pro Aussparung pipettiert. Die Inkubation erfolgt wie beim Primärantikörper. Anschließend wird 10 min. in Tween®-TBS gewaschen. Die Feuchtigkeit zwischen den Aussparungen wird abgesaugt. Die Vertiefung wird mit Mounting-Puffer vollständig bedeckt. Ein Deckgläschen wird blasenfrei aufgesetzt und anschließend mit klarem Nagellack versiegelt. Das Präparat ist bei 4°C einige Wochen haltbar. Die Präparate werden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem entsprechenden Filter untersucht und mit einer Videokamera digital dokumentiert.

Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper sind im Folgenden aufgeführt:

Primäre Antikörper (monoklonale):

Bezeichnung		Referenz
3NB12	21 Pharynxmuskelzellen und 4 Neurone	Priess and Thomson, 1987
NE8 4C6.3	81 Körpermuskelzellen (Antigen Paramyosin)	MRC; LMB, Cambridge
5-6	81 Körpermuskelzellen (Antigen MYO-3)	MRC; LMB, Cambridge
P4G5	PIE-1 Protein	Tenehaus <i>et al</i> , 1998

Sekundäre Antikörper:

Bezeichnung		Referenz
Cy-3	goat anti mouse	Jackson Research Lab.
Cy-3	mouse anti rabbit	Jackson Research Lab.

Ablationsexperimente

Die Embryonen werden wie unter „Immunfluoreszenzfärbung“ beschrieben auf einem Objektträger präpariert. Die Ablationen werden mit einem Farbstofflaser (VSL-337ND, Laser Science Inc., Farbstoff: Coumarin2, $\lambda = 453 \text{ nm}$) durchgeführt, der mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop verbunden ist. Die Stärke des Lasers wird vor jedem Experiment überprüft. In ein Deckglas werden mit dem Laserstrahl (Puls = 20 s^{-1}) Löcher gebrannt, deren Größe der Stärke direkt proportional ist. Bei Ablationen von Blastomeren bis zum 12-Zellstadium sollte die Größe der Löcher

1,2 – 1,7 cm x 2,0 – 2,6 cm (Messung auf dem Monitor bei 3fach Zoom des Optovars) betragen, bei späteren Blastomeren mindestens 0,7 cm x 1,0 cm (Schnabel, 1991; Sulston *et al.*, 1983; Sulston und White, 1980).

Die Dauer der Bestrahlung mit dem Laser beträgt für ABa 40 – 45 Sekunden, für MSa bzw. MSp 15 - 25 Sekunden. Ablatierte Blastomeren sollten einen aufgelösten Zellkern aufweisen. Außerdem wird vor der Fixierung mit dem Lichtmikroskop überprüft, dass aus den ablatierten Zellen keine ausdifferenzierten Zellen hervorgegangen sind. Ein Präparat wird ausgewertet, wenn ein nicht ablatiertes Embryo (Kontrolle) auf demselben Objektträger ist.

Nach dem Ablatieren werden die Embryonen 7 - 7,5 Stunden bei 25°C inkubiert. Danach wird eine Aufnahme von den ablatierten Embryonen gemacht und Besonderheiten notiert. Die Fixierung und Färbung mit Antikörpern erfolgt wie unter „Immunfluoreszenzfärbung“ beschrieben.

Mikroinjektion von Würmern

Die Mikroinjektion von Würmern wird zum einen zur Transformation von Würmern mit DNA und zum anderen für die Methode des RNAi (RNA-mediated interference) benutzt.

Für das Injizieren werden zunächst Agarosekissen vorbereitet. Auf ein rundes Deckglas wird ein Tropfen erhitzte 2%ige Agaroselösung gegeben und durch Auflegen eines zweiten Deckglases gleichmäßig verteilt. Nachdem die Agarose erstarrt ist, wird das aufgelegte Deckglas vorsichtig entfernt (Dauer 1 bis 2 Minuten). Das Agarosekissen wird ein paar Stunden (oder über Nacht) auf einem Heizblock (80°C) getrocknet.

Für die Injektion werden Injektionsnadeln mit dem Nadelziehgerät BB-CH (Fa. FMI GmbH, Pohlheim, Deutschland) ausgezogen.

Die DNA- bzw. RNA-Lösung wird 4 min. bei 14000 rpm zentrifugiert, damit Partikel, die sich in dieser Lösung befinden, pelletiert werden. Mit einer „Gel loader“-Pipettenspitze wird die gewünschte Menge (2 bis 5 µl) in die Injektionsnadel pipettiert. Die Lösung wird durch Schütteln in die Nadelspitze gebracht. Die Nadel wird in die dafür vorgesehene Halterung des Mikromanipulators am Mikroskop (Axiovert, Fa. Zeiss) befestigt. Sie muss so mit dem Mikromanipulator

ausgerichtet werden, dass sie in der Mitte des Sichtfeldes erst bei 5fachem, dann bei 40fachem Objektiv zu sehen ist. Mit einer Mikropumpe stellt man den gewünschten Injektionsdruck ein (ca. 20 psi).

Für die Injektion werden junge Adulte, die einige Eier in sich tragen, verwendet. Auf ein getrocknetes Agarosekissen wird ein Tropfen Öl gegeben. In diesen Tropfen wird ein Wurm transferiert. Damit der Wurm ruhig liegt, wird er mit einer Wimper auf das Agarosekissen gedrückt. Der Wurm wird dehydriert und dadurch fixiert.

Mit Hilfe des Gleittisches des Mikroskops wird der Wurm in die Mitte und mit der Vulva von der Nadel weg platziert. Die Nadel wird abgesenkt, so dass die Gonade und die Nadel in einer Ebene fokussiert sind. Durch Druck auf den Tisch wird die Nadel in die Gonade gebracht. Der Druck der Pumpe sollte der jeweiligen Nadel angepasst werden. Es werden beide Gonadenarme injiziert.

Es wird ein Tropfen M9-Puffer auf das Öl oberhalb des Wurmes gegeben. Dieser Tropfen sinkt unter das Öl, rehydriert den Wurm, der sich dann von dem Agarosekissen ablöst. Der Wurm wird nun auf eine frische, kleine Platte transferiert und bei 20°C inkubiert. Drei Tage nach dem Injizieren kann in der F1-Generation nach Transformanten für das Markergen (z.B. ein Plasmid mit dem GFP-Gen und einem muskelspezifischen Promotor) gesucht werden. Die Transformanten werden vereinzelt. In der nächsten Generation wird kontrolliert, ob stabile Linien auftreten. Diese werden dann weiter untersucht. Für die RNAi Experimente werden die injizierten Würmer alle 6-10 Stunden transferiert und kontrolliert, ob bei den Nachkommen ein Phänotyp aufgrund der posttranskriptionellen Inaktivierung des Gens auftritt.

Ballistische Transformation von *C.elegans*

Die ballistische Transformationsmethode von *C.elegans* stellt eine einfache Alternative zur Mikroinjektion für die Transformation dar (Wilm *et al.*, 1999).

Vorbereitung von *C.elegans* zur Ballistischen Transformation

Die Transformationseffizienz ist stark abhängig von dem Entwicklungsstadium der Hermaphroditen (möglichst junge Adulte mit drei bis zehn Eiern). Pro Schuss

werden ein bis zwei gut bewachsene synchrone große Platten benötigt. Die Platten werden mit 4 ml M9 Puffer abgespült und die Nematoden in einem 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Würmer setzen sich nach ein paar Minuten ab und der Überstand kann entfernt werden. Parallel dazu wird für jeden Schuss eine kleine Platte, die mit einem Tropfen OP50 beimpft wurde, auf Eis gekühlt. Jeweils 20µl der Wurm suspension werden auf kleine, kalte Platten pipettiert. Aufgrund der kalten Platte erstarren die Würmer sofort. Nach ca. 10 Minuten Inkubation (zur Trocknung) können die Würmer beschossen werden.

Vorbereitung der DNA für die Transformation

Bei dieser Methode wird die DNA zusammen mit Goldpartikeln auf die Würmer geschossen. Für jedes DNA-Gemisch, das transformiert werden soll, werden 1mg Gold (0,3 - 3 µm Ø) in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) eingewogen. 100µl einer 50mM Spermidinlösung werden zugegeben und gemischt. Diese Mischung wird für 10 Sekunden in ein Ultraschallbad gegeben und anschließend für 10 min. bei Raumtemperatur unter wiederholtem leichtem Mischen inkubiert. 16µg des DNA-Gemisches (Konstrukt und Transformationsmarker im Verhältnis 1:1) werden zugegeben und 10 min inkubiert. Die Lösung wird mit dH₂O auf 360µl aufgefüllt und für weitere 10 min. bei Raumtemperatur unter wiederholendem leichtem Mischen inkubiert. Mit tropfenweiser Zugabe von 100µl CaCl₂ (1M) wird die DNA 10 min. präzipitiert. Das DNA Gold Gemisch wird zentrifugiert (15 sec., 13000rpm). Der Überstand wird entfernt und 3mal mit 1ml Ethanol gewaschen. Das Pellet wird anschließend in 200µl PVP-Lösung aufgenommen und vollständig resuspendiert. Für jeden Schuss werden dann 20µl der Lösung eingesetzt.

Beschuss der Würmer

20µl der PVP-Lösung werden in die Apparatur eingebracht, ein Vakuumdruck von 0,4 bar aufgebaut und die Heliumkanone ausgelöst. Das DNA Gold Gemisch wird mit einem Druck von 8 bar auf die Würmer geschossen.

Die kleinen Schussplatten werden dann in sechs Teile aufgeteilt und auf große Platten verteilt. Nach etwa einer Woche können die Nachkommen der beschossenen Würmer auf Transformationsereignisse hin untersucht werden.

Selektion der Transformanten

Es wurden verschiedene Transformationsmarker für die Selektion von Transformanten eingesetzt. Das *pha-1* Selektionssystem beruht auf der Komplementation der temperatursensitiven Mutation (*e2123*) des *pha-1* Gens (Granato *et al.*, 1994). Die Mutation wird durch die in dem Vektor pBX enthaltene Wildtypkopie des *pha-1* Gens komplementiert. Die beschossenen Würmer werden bei 25°C inkubiert, so dass nur Nachkommen überleben, die den Transformationsmarker exprimieren.

Ein anderes Selektionssystem beruht auf der Expression des GFP Proteins. Die Nachkommen der beschossenen Würmer werden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Biokular MZIII Fluor, Leica) auf GFP Expression hin untersucht. Die GFP positiven Nachkommen werden dann vereinzelt. In dieser Arbeit wurden die Vektoren pGK10 und ppD118.33 als Transformationsmarker benutzt. Der Vektor pGK10 exprimiert das GFP unter der Kontrolle des *Serca* Promotors (Zwaal *et al.*, 2001). Transformierte Würmer exprimieren das GFP in allen Körpermuskelzellen. Der Vektor ppD118.33 stammt aus dem Labor von A. Fire und exprimiert das GFP unter der Kontrolle des *myo-2* Promotors (Moghal und Sternberg, 2003). Das GFP ist damit in den Pharynxmuskelzellen lokalisiert.

Molekularbiologische Methoden

Folgende molekularbiologische Standardverfahren wurden, sofern nicht anders angegeben, streng nach oder in Anlehnung an Vorschriften aus den Methodenbüchern „Molecular Cloning“ (Sambrook, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel, 1992) durchgeführt: Fällung von Nukleinsäuren; Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen; Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten; Agarose-Gelelektrophorese von DNA.

Plasmidminipräparation

3 ml LB (+Antibiotika) werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmid-Isolation erfolgt mit Hilfe des Kits „QIAprep®8 Miniprep Kit (50)“ entsprechend dem Protokoll.

Plasmidmidipräparation

Größere Mengen an Plasmid DNA werden mit dem Kit „Plasmid Midi Kit (100)“ der Firma Qiagen isoliert. Die Durchführung erfolgte laut dem beiliegenden Protokoll.

Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen

Die Elution der DNA erfolgt mit Hilfe des „MinElute Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen. Die Elution wurde laut Handbuch durchgeführt.

Aufreinigung von PCR Produkten

Für bestimmte Zwecke wurden die PCR Reaktionen nach der Amplifikation aufgereinigt. Dieses erfolgte mit Hilfe des Kits „MinElute PCR Purification Kit“. Die Aufreinigung wurde laut Protokoll durchgeführt. Dieses Kit wurde auch für die Aufreinigung von Restriktionsansätzen benutzt.

„Single Worm Lysis“

Diese Methode der DNA-Isolierung wird angewendet um genomische DNA für PCR aus wenigen Würmern zu erhalten.

- 100 µl „Single-Worm Lysis Buffer“
- 20 – 50 adulte Würmer
- 4 µl Proteinase K (20 mg / ml in H₂O)
- Inkubation bei 60°C für 1 Stunde
- Inaktivierung der Proteinase K bei 94°C für 10 min.

Die genomische DNA ist nun für PCR-Reaktionen brauchbar.

PCR - Polymerase Chain Reaction

Für diese Arbeit wurden verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet: Mit der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) wurden DNA-Abschnitte amplifiziert, die für die Herstellung von Konstrukten dienten, die in *C.elegans* exprimiert werden sollten. Die *Pfu*-Polymerase hat „proof-reading“ Aktivität und zeichnet sich durch eine besonders geringe Fehlerrate aus. Außerdem wurde zur Amplifizierung von sehr großen DNA-Fragmenten die Herkulase-Polymerase (Stratagene) verwendet. Auch diese Polymerase hat

„proofreading“ Aktivität. Alle anderen PCR-Reaktionen wurden mit einer der folgenden Polymerasen durchgeführt: Pro-HA Polymerase (Eurogentec), *Taq* DNA Polymerase (Qiagen) oder rekombinante *Taq* DNA Polymerase (Fermentas).

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die zugesandten lyophilisierten Primer werden in ddH₂O gelöst.

Die PCR Ansätze sowie die Programme der Thermocycler wurden den jeweiligen Gegebenheiten angepasst.

TOPO TA oder Blunt End Klonierung

Die PCR Produkte wurden zum Teil mit dem TOPO TA oder dem TOPO BluntEnd Kit (Invitrogen) kloniert. Die Klonierung und die anschließende Transformation in die hyperkompetenten „One Shot[®]“ Zellen (Invitrogen) erfolgte laut Handbuch.

Sequenzierung (ABI Prism[®])

Die Sequenzreaktionen werden mit dem System „ABI Prism[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Handbuch 1998) durchgeführt und in dem Sequenziergerät „ABI Prism 310“ analysiert.

Reaktionsansatz (für PCR-Produkte):

2 µl Premix
1 µl Primer (5 pmol / µl)
x µl PCR-Produkt (20 – 50 ng)
mit dest. H₂O auf 10 µl auffüllen

Temperaturprogramm:

Deckel 110°C
96°C 30 sec.
XX°C 15 sec. (Annealing-Temperatur je nach Primer)
60°C 4 min.
25 mal wiederholen
4°C halten

Fällen:

Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von 40 µl H₂O, 5 µl 3M NaAc pH 5,2, 125 µl 100 % Ethanol (RT) und 1 µl Dextran-blue-Lösung (20mg / ml) und anschließender Zentrifugation (15 min., 14000rpm) gefällt. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wird das Pellet getrocknet.

Sequenzierung:

Das Pellet wird in 12,5 µl TSR-Puffer aufgenommen und die DNA 2 min. bei 90°C denaturiert. Die Lösung wird dann in Sequenzierreaktionsgefäße überführt und steht damit für Beladung des Sequenzierers bereit.

Herstellung von dsRNA für RNAi-Experimente

Mit Hilfe der Methode des RNAi (RNA mediated interference) lassen sich spezifisch Gene ausschalten. Es wird die doppelsträngige RNA des Gens, das ausgeschaltet werden soll, über Injektion oder Fütterung in den Wurm eingebracht (Fire *et al.*, 1998).

Amplifikation der cDNA:

Von den mittels RNAi getesteten Genen wurde zunächst die cDNA amplifiziert. Die Herstellung der cDNA und das anschließende Amplifizieren der cDNA erfolgte mit dem „ProSTAR® Ultra HF RT-PCR“ System (Stratagene). Die RT-PCR Ansätze sowie die Programme der Thermocycler wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst.

Nach der RT-PCR wird ein Teil des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt. Wenn das erwartete Produkt vorhanden ist, wird dieses mit dem TOPO TA Cloning Kit kloniert. Die erhaltenen Klone werden auf ihre Sequenz kontrolliert. Von den „richtigen“ Klonen wird dann eine PCR gemacht. Das erhaltene PCR-Produkt wird aufgereinigt und für die *in vitro* Transkription eingesetzt.

Herstellung der dsRNA:

Die doppelsträngige RNA wird in einer *in vitro* Transkriptionsreaktion hergestellt. Für diese Reaktion wurde eines der folgenden Systeme eingesetzt.

„RiboMax™ Large Scale RNA Production Systems – SP6, T3, T7“ (Promega) oder „MEGAscript® – SP6, T7, T3“ (Ambion). Die Durchführung erfolgte jeweils laut Protokoll.

Aufreinigung der RNA:

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem System „RNeasy MinElute Cleanup Kit“ (Quiagen). Es wurde laut Protokoll vorgegangen.

Zur Kontrolle wird 1 µl der eluierten RNA-Lösung auf einem Agarosegel aufgetragen. Ein Teil der Einzelreaktionen (SP6, T3 bzw. T7) wurde dann miteinander vereinigt und 10 min. bei 56°C inkubiert. Damit die einzelsträngige RNA sich nun zu einer dsRNA anlagern kann, wird 30 min. bei 37°C inkubiert. Die RNA kann jetzt für die Injektion (siehe Mikroinjektion von Würmern) benutzt werden.

DNA Isolierung aus *S.cerevisiae*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus der Hefe *S.cerevisiae* wurde das „Qiagen Genomic Tip 20/G“ benutzt. Die Durchführung erfolgte laut Handbuch.

Transformation der Hefe *S.cerevisiae*

Zunächst wurde eine erste Vorkultur (3ml YPD) von 2 bis 3 frischen Hefekolonien angeimpft. Nach 8 bis 10 Stunden Inkubation (30°C, Schütteln) wurde die zweite Vorkultur (50ml YPD) mit der ersten angeimpft. Diese Kultur wurde 10 bis 14 Stunden inkubiert. Die Hauptkultur (300ml YPD) wurde dann mit 30ml der zweiten Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde solange bei 30°C inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 erreicht hat. Die Zellen werden dann in großen Hefetransformationsröhrchen pelletiert (5 min, 1000g, RT) und einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 1,5ml 1xTE/1xLiAc resuspendiert und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die zu transformierende Plasmid DNA (0,1µg) wird mit Heringssperma DNA (vorher 5min aufkochen) gemischt. 100µl der kompetenten Hefezellen und 600µl PEG/LiAc Lösung werden zu der DNA gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Stunde Inkubation bei 30°C werden 70µl DMSO hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Dann werden die Hefezellen einem Hitzeschock ausgesetzt (15 min,

42°C). Die Hefezellen werden dann auf Selektionsplatten ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Da die in dieser Arbeit durch die Transformation eine Integration des eingebrachten Plasmids auf den in der Hefe vorliegenden YAC erreicht werden sollte, wurden die auf dem Selektionsmedium wachsenden Kolonien noch einem weiteren Test ausgesetzt. Dieses diente der Kontrolle der Integration auf dem YAC. Für das ULP-1::GFP Konstrukt wurde getestet, ob die verschiedenen Selektionsmarker des YACs (Ura-Marker) und des Plasmids (G418-Resistenz) zusammen segregieren oder unabhängig. Dazu wurden einzelne Kolonien zunächst ohne Selektion in Flüssigmedium kultiviert und anschließend auf Vollmedium (YPD) ausgestrichen. Von den ausgestrichenen Platten wurden jeweils 50 Einzelkolonien auf Vollmedium transferiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien durch Stempeln auf die verschiedenen Selektionsplatten (-Ura, -Ura + G418, +Ura, +Ura + G418) transferiert und nach weiteren drei Tagen ausgewertet. Die für die Transformation eingesetzte DNA wurde dann aus einem Hefestamm isoliert, der die beiden Marker (ura und G418-Resistenz) in vier Fällen (von 50) verlor. In zwei Fällen (von 50) ging lediglich die G418-Resistenz verloren. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass die Integration auf dem YAC eine Tandem-Duplikation zur Folge hat. In der Hefe kommt es in solchen Fällen häufig zu einer Rekombination, wodurch Teile der Duplikation und nahe liegende Bereiche verloren gehen können. Da andere getestete Transformanten (in denen das Plasmid im Genom integriert vorlag) ein anderes Verhalten zeigten, wurden die oben beschriebenen Ergebnisse so interpretiert, dass das Plasmid auf dem YAC integriert vorliegt.

DeUbiquitinierungsassay

Der DeUbiquitinierungsassay wurde wie in Kaitna et al. (2002) beschrieben durchgeführt. Die Expressionvektoren, außer dem ULP-1 exprimierenden, stammen aus dem Labor von M. Glotzer (Wien). Die *C.elegans* Gene für Ubiquitin, SUMO, Nedd8 und ein weiteres (*ubl-1*) wurden mittels PCR amplifiziert und in den LacZ Expressions Vektor pPD8.02 (Fire et al., 1990) kloniert, um eine N-terminale Fusion der Proteine mit der β -Galaktosidase (β -Gal) zu erhalten. Zur Unter-

scheidung des von dem Vektor exprimierten β -Gal und dem endogenen β -Gal wurde ein 620bp großes *HpaI* Fragment aus dem Gen entfernt. Das als Positivkontrolle eingesetzte Doa4p wurde aus genomischer DNA von *S.cerevisiae* amplifiziert und in den Vektor pET28a kloniert. Die cDNA des in dieser Arbeit untersuchten *ulp-1* Gens wurde ebenfalls in den pET28a Vektor kloniert (siehe unten). Die pET28a basierenden Expressionsvektoren tragen eine Kanamycin-Resistenz, die β -Gal Vektoren eine Ampicillin-Resistenz.

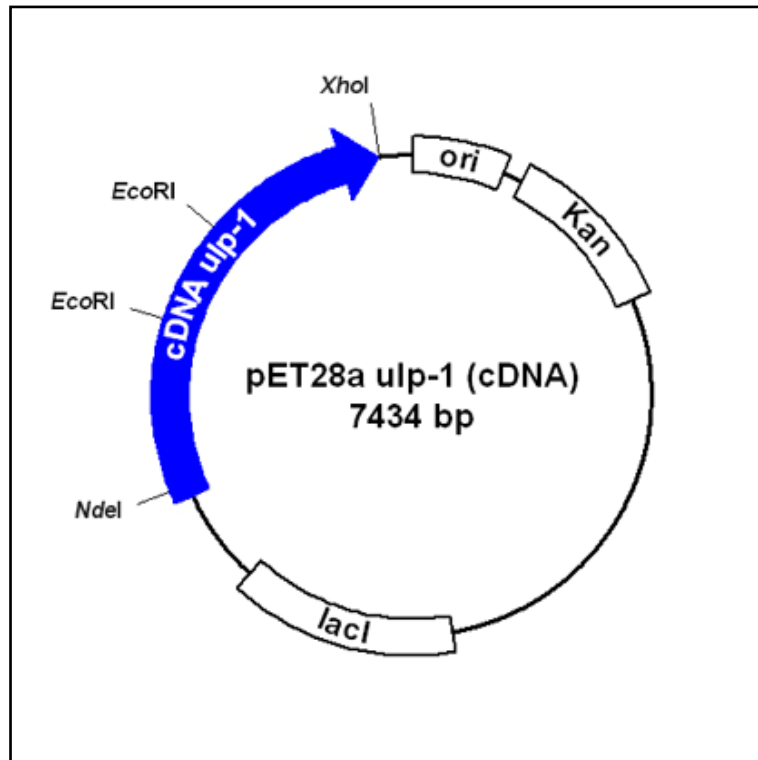
Die Zellen wurden zunächst in einer Vorkultur (5ml LB mit den entsprechenden Antibiotika, Kanamycin 20mg/l, Ampicillin 50 mg/l) über Nacht angezogen. Die 50ml Hauptkultur (mit den entsprechenden Antibiotika) wird bis zum Erreichen einer OD₆₅₀ von 0,6 bis 0,7 geschüttelt (37°C). Die Induktion erfolgt dann durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM). Nach 165 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1ml Puffer W resuspendiert. In diesem Puffer wurden die Zellen durch Sonifizieren aufgeschlossen. Die Zellreste wurden abzentrifugiert und der Überstand für die weiteren Schritte abgenommen.

Von allen Proben wurden jeweils 30µg Gesamtprotein in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der primäre Antikörper (Anti- β -Galactosidase mAb, Promega) bindet spezifisch das β -Gal Protein, als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate Antikörper eingesetzt. Durch das ECL System (Amersham) wurden die detektierten Banden dann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

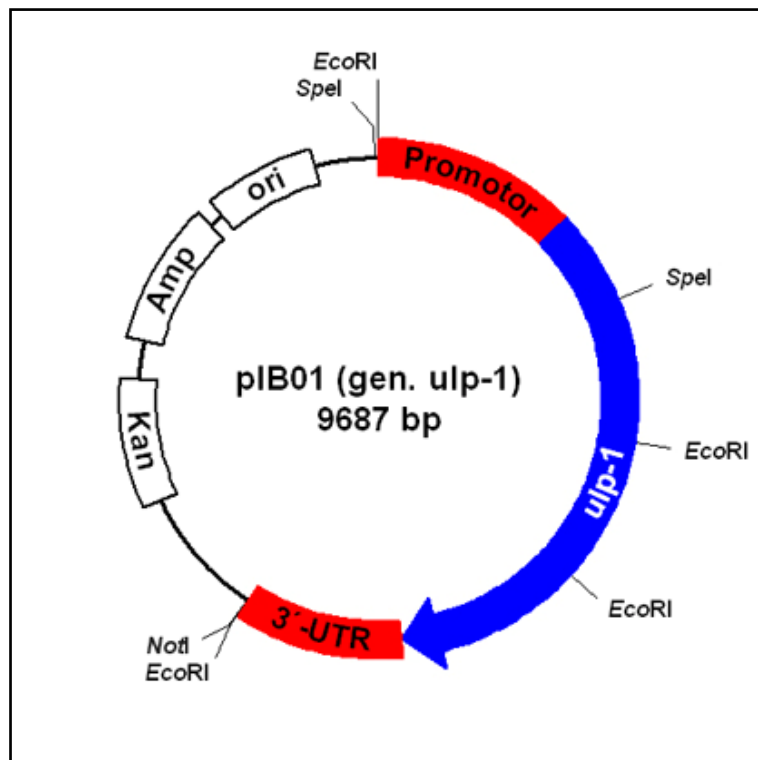
Konstruierte Plasmide

Die hier beschriebenen Plasmide wurden während dieser Arbeit konstruiert und sind für verschiedene Teile der Arbeit relevant.

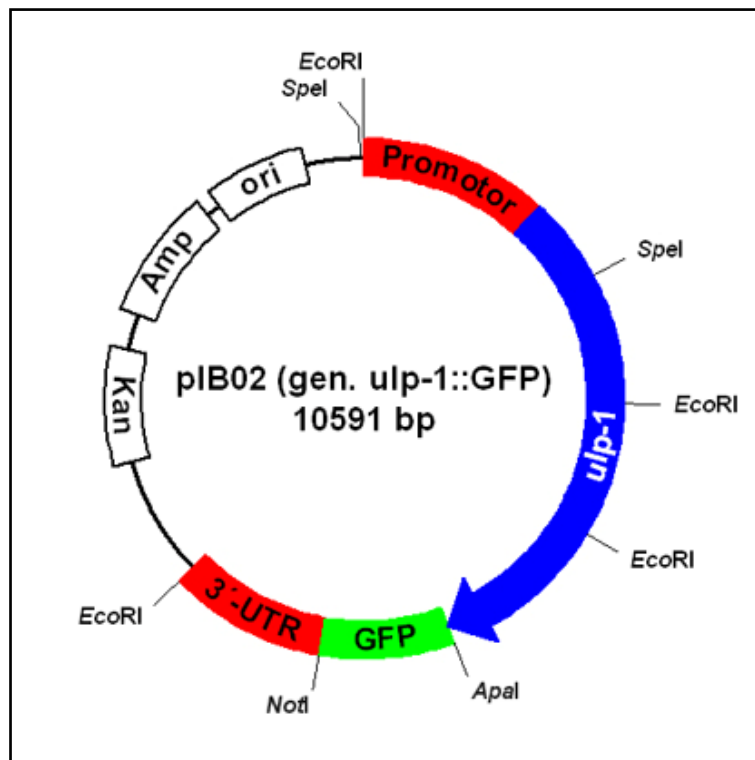
pET28a *ulp-1* cDNA



Die cDNA des Gens *ulp-1* (2094 bp) aus *C.elegans* wurde mittels RT-PCR amplifiziert und in den pCR4 TOPO Vektor zwischenkloniert und mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *XhoI* herausgeschnitten. Der pET28a Vektor wurde zunächst mit *BamHI* geschnitten und die Schnittstelle mit einer Klenow Reaktion aufgefüllt. Anschließend wurde dieser linearisierte Vektor mit *XhoI* geschnitten und die *ulp-1* cDNA gerichtet in den pET28a Vektor ligiert. Dieser Vektor exprimiert unter der Kontrolle des lac Operators in *E.coli* das ULP-1 Protein und wurde in dem DeUbiquitinierungsassay eingesetzt.

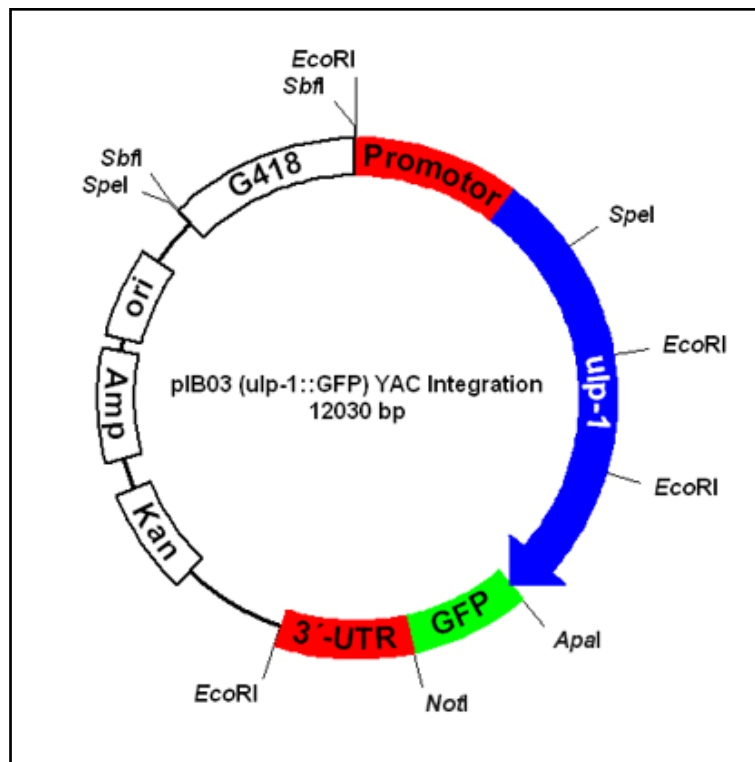
pIB01 (gen. *ulp-1*)

Das Plasmid pIB01 enthält das genomische Fragment des *ulp-1* Gens aus *C.elegans*. Das Insert (5730 bp) wurde aus genomischer DNA amplifiziert und in den pCR4 Vektor mit Hilfe des TOPO TA Systems kloniert. Dieses Plasmid wurde zur Komplementierung der *ulp-1* (*t1530*) Mutante eingesetzt. Das genomische Fragment umfasst den gesamten ORF des *ulp-1* Gens (3461 bp) sowie 1239 bp des Promotorbereiches und 1030 bp des 3'-untranslatierten Bereiches.

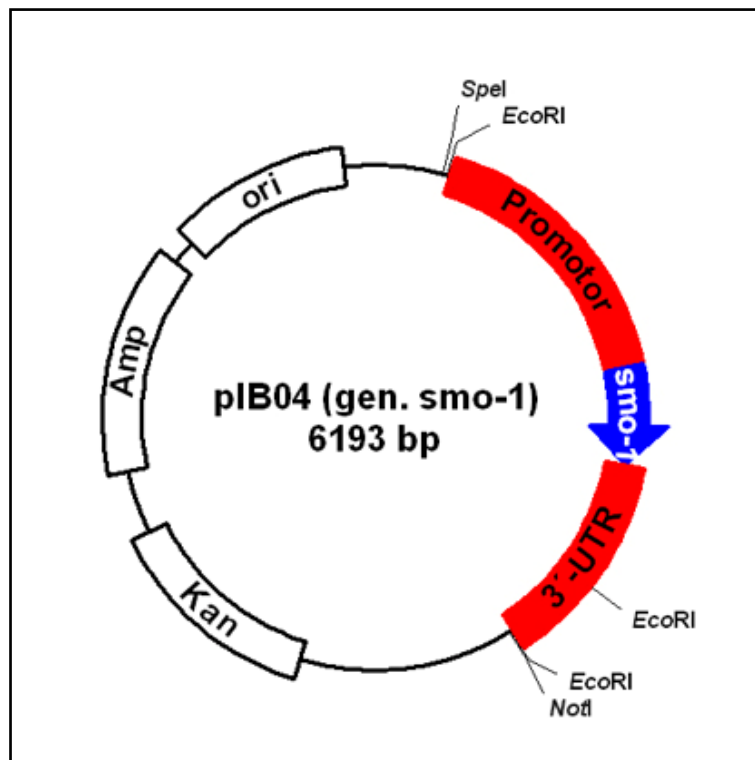
pIB02 (gen. *ulp-1::GFP*)

Das Plasmid pIB02 entstand aus pIB01. Zunächst wurde die *NotI* Restriktionsschnittstelle durch eine Klenow Reaktion aufgefüllt. Mit Hilfe der PCR wurden dann die beiden Restriktionsschnittstellen (*Apal* und *NotI*) vor das Stopp-Codon des *ulp-1* Gens eingefügt. Der ORF für das GFP wurde dann über diese beiden Restriktionsschnittstellen inseriert. Die mit diesem Plasmid transformierten Würmer exprimieren ein C-terminales Fusionsprotein bestehend aus dem ULP-1 Protein und dem GFP Protein. Der Vektor wurde für Expressionsanalysen benutzt.

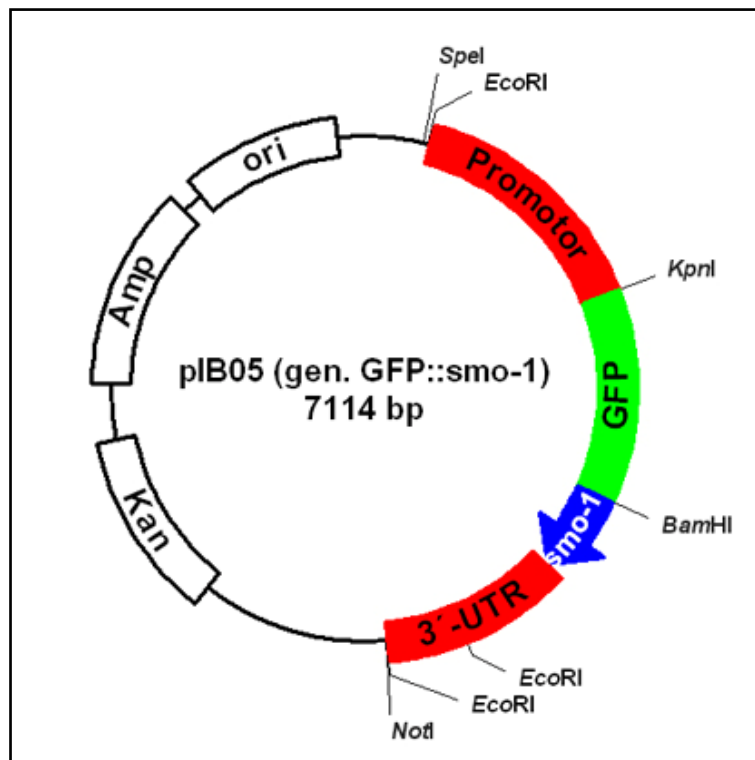
pIB03 (gen. *ulp-1::GFP*) YAC Integration



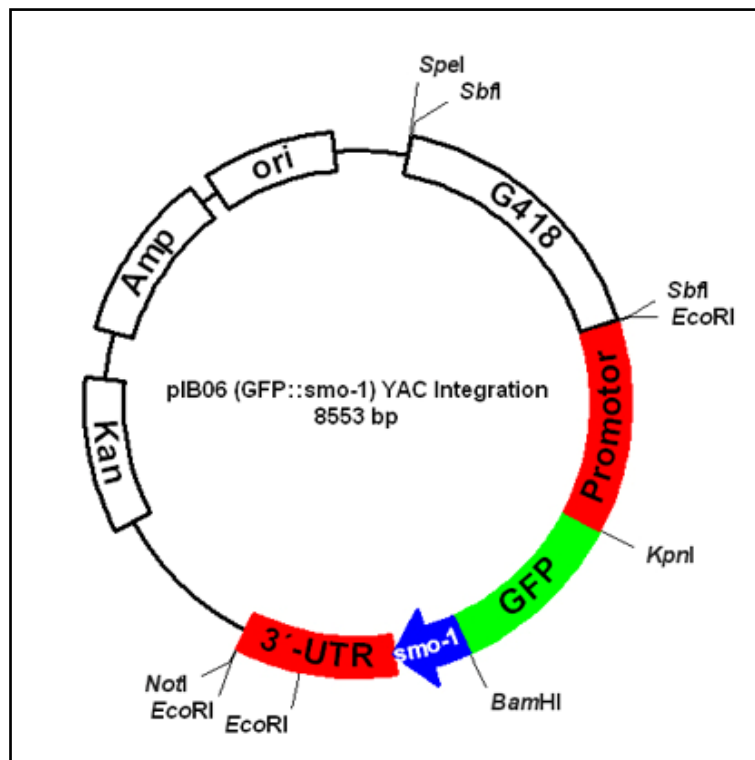
Das Plasmid pIB03 basiert auf dem Plasmid pIB02. Hier wurde über die *SbfI* Schnittstelle eine G418 Resistenz für die Hefe *S.cerevisiae* in das Plasmid inseriert. Das G418 Resistenzgen ist unter der Kontrolle eines Promotors aus dem Organismus *Ashbya gossypii* (Guldener *et al.*, 1996), der keine homologen Sequenzen in der Hefe besitzt. Die Hefe nutzt den Promotor um das Resistenzgen zu exprimieren. Der Promotor wurde gewählt, da das Plasmid über homologe Rekombination in den YAC integriert werden sollte. Aus diesem Grund sollten möglichst keine homologen Sequenzen mit dem Hefegenom auf dem Plasmid enthalten sein. Der YAC enthält den genomischen Bereich des *ulp-1* Gens aus *C.elegans*, der auch auf dem Plasmid vorhanden ist. Der Vektor enthält zudem keinen Replikationsstartpunkt, welcher von der Hefe genutzt werden kann, so dass die Hefe unter selektiven Bedingungen nur wachsen kann, wenn die G418 Resistenz im Genom bzw. in dem YAC integriert ist.

pIB04 (gen. *smo-1*)

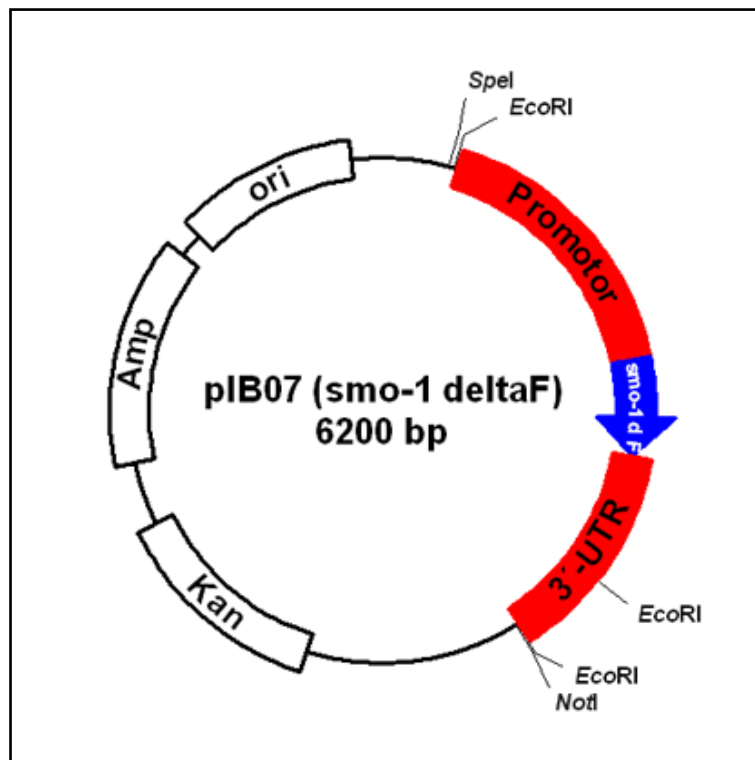
Das Plasmid pIB04 besteht aus dem mit der PCR amplifizierten genomischen Fragment (2236 bp) des *smo-1* Gens aus *C.elegans* und dem pCR4 Vektor, in den das PCR Produkt mit dem TOPO TA System kloniert wurde. Der ORF des *smo-1* Gens umfasst 382 bp. Das Insert enthält zudem eine 1055 bp große Promotorsequenz und die 3'-UTR Sequenz (799 bp). Dieses Plasmid wurde für weitere Klonierungen benutzt.

pIB05 (gen. GFP::*smo-1*)

Das Plasmid pIB05 basiert auf pIB04 und enthält zusätzlich das GFP Protein als N-terminale Fusion mit dem *smo-1* Gen. Zunächst wurden vor dem Startcodon des *smo-1* ORFs die Schnittstellen *KpnI* und *BamHI* eingebracht. Anschließend wurde das GFP in diese Restriktionsschnittstellen eingebracht. Dieses Plasmid wurde zur Expression des N-terminalen Fusionsproteins GFP::SMO-1 in *C.elegans* und damit für Expressionsanalysen benutzt.

pIB06 (GFP::*smo-1*) YAC-Integration

Dieses Plasmid wurde zur Integration auf den YAC, der den genomischen Bereich des *smo-1* Gens beinhaltet, genutzt. Es enthält zusätzlich zu den Sequenzen des Plasmids pIB05 die G418 Resistenz für die Hefe, welche die Selektion auf eine Integration erlaubt. Das G418 Resistenz Gen mit dem Promotor wurde in die *SbfI* Schnittstelle des pCR4 Vektors eingebracht.

pIB07 (*smo-1* delta F)

Das Plasmid pIB07 basiert auf dem Plasmid pIB04. In diesem Fall ist das für die letzte Aminosäure kodierende Triplett vor dem Stopp-Codon des *smo-1* Gens deletiert. Die mit diesem Plasmid transformierten Würmer exprimieren das SMO-1 Protein in einer reifen Form, in der es an die Zielproteine gebunden werden kann, ohne dass zuvor ein Reifungsprozess durch eine ubiquitin-ähnliche Protease (z.B. *ulp-1*) stattfinden muss.

PIE-1::GFP K68A

Das PIE-1::GFP K68A Plasmid entstand aus dem Plasmid pJH3.92 (Reese *et al.*, 2000), welches ein 7,7 kb großes genomisches Fragment des *pie-1* Gens enthält (ORF mit 2430 bp des Promotorbereiches und 3202 bp der 3'-UTR). Das GFP ist in diesem Plasmid direkt vor dem Stopp-Codon des *pie-1* Gens inseriert, so dass ein C-terminales Fusionsprotein aus PIE-1 und dem GFP translatiert wird. Dieses Plasmid komplementiert *pie-1* Mutationen.

Um das Triplet (AAG), welches für das Lysin 68 kodiert, so zu mutieren, dass es für ein Arginin (GCG) kodiert, wurde ein 940bp großes Fragment mit Primern, die die gewünschte Sequenz enthält, amplifiziert. Anschließend wurde das entsprechende Fragment in das Plasmid pJH3.92 über die Restriktionschnittstellen *BsiWI* und *AfeI* durch das mutierte Fragment ersetzt. Das resultierende Plasmid (pIB08) exprimiert, in *C.elegans* eingebracht, eine mutierte Form des PIE-1 Proteins, in welchem die potentielle SUMOylierungsstelle (Lysin 68) durch ein Arginin ersetzt wurde.

Computerunterstützte Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme umfassen neben Standardprogrammen (wie Microsoft Office) die in der folgenden Liste aufgeführten Programme.

Programm	Verwendung
ACDSee	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator	Vektor Grafiken
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
EditSeq (DNASStar)	Sequenzanalyse
IrfanView	Bildbearbeitung
LSM Image Examiner (Zeiss)	Auswertung LSM Bilder
MapDraw (DNASStar)	Sequenzanalyse
MegAlign (DNASStar)	Sequenzvergleich
Steuerprogramm (A.-K. Schulz, R.Schnabel)	Mikroskopsteuerung
pDRAW32 (Freeware)	Plasmidzeichnungen
PrimerSelect (DNASStar)	Primerauswahl
SeqMan (DNASStar)	Sequenzierauswertung

Literatur

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. T., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.** (1992). Current protocols in Molecular Biology.
- Bailey, D. and O'Hare, P.** (2004). Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem* **279**, 692-703.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. and Becker, J.** (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**, 275-86.
- Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E. and Freemont, P. S.** (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* **13**, 971-82.
- Brenner, S.** (1973). The genetics of behaviour. *Br Med Bull* **29**, 269-71.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Broday, L., Kolotuev, I., Didier, C., Bhoumik, A., Gupta, B. P., Sternberg, P. W., Podbilewicz, B. and Ronai, Z.** (2004). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is required for gonadal and uterine-vulval morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **18**, 2380-91.
- Büssing, I.** (2000). Phänotypische und molekularbiologische Analyse der Pharynxmutante *t1530* in *Caenorhabditis elegans*. *Diplomarbeit, TU Braunschweig*.
- Bylebyl, G. R., Belichenko, I. and Johnson, E. S.** (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* **278**, 44113-20.
- Conradt, B. and Horvitz, H. R.** (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-29.
- DeRenzo, C., Reese, K. J. and Seydoux, G.** (2003). Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature* **424**, 685-9.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. and Hay, R. T.** (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* **2**, 233-9.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-4.
- Droin, A.** (1992). The developmental mutants of *Xenopus*. *Int J Dev Biol* **36**, 455-64.
- Eldadah, B. A. and Faden, A. I.** (2000). Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* **17**, 811-29.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-29.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.

- Fraser, A. G., James, C., Evan, G. I. and Hengartner, M. O.** (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* **9**, 292-301.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30.
- Gill, G.** (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-59.
- Goldstein, B.** (1995). An analysis of the response to gut induction in the *C. elegans* embryo. *Development* **121**, 1227-36.
- Golebiowski, F., Szulc, A., Sakowicz, M., Szutowicz, A. and Pawelczyk, T.** (2003). Expression level of Ubc9 protein in rat tissues. *Acta Biochim Pol* **50**, 1065-73.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G. G. and Yeh, E. T.** (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* **275**, 3355-9.
- Granato, M., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1994). pha-1, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res* **22**, 1762-3.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J. H.** (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R. et al.** (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* **107**, 27-41.
- Hamon, Y., Chambenoit, O. and Chimini, G.** (2002). ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 64-71.
- Hang, J. and Dasso, M.** (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* **277**, 19961-6.
- Hannich, J. T., Lewis, A., Kroetz, M. B., Li, S. J., Heide, H., Emili, A. and Hochstrasser, M.** (2004). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Hay, R. T.** (2005). SUMO A History of Modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- Hershko, A.** (1988). Ubiquitin-mediated protein degradation. *J Biol Chem* **263**, 15237-40.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41.
- Hoepfner, D. J., Hengartner, M. O. and Schnabel, R.** (2001). Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **412**, 202-6.
- Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. D. and Hunter, T.** (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* **275**, 26661-4.
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1994). glp-1 and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051-64.

- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1995). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* **121**, 3417-24.
- Jesenberger, V. and Jentsch, S.** (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 112-21.
- Johnson, E. S.** (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Johnson, E. S. and Gupta, A. A.** (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**, 735-44.
- Jones, D., Crowe, E., Stevens, T. A. and Candido, E. P.** (2002). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0002.
- Kadota, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M. and Kikuchi, A.** (2002). Desumoylation activity of Axin, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of beta-catenin. *Mol Cell Biol* **22**, 3803-19.
- Kaitna, S., Schnabel, H., Schnabel, R., Hyman, A. A. and Glotzer, M.** (2002). A ubiquitin C-terminal hydrolase is required to maintain osmotic balance and execute actin-dependent processes in the early *C. elegans* embryo. *J Cell Sci* **115**, 2293-302.
- Kaletta, T.** (1998). Binäre Spezifizierung der embryonalen Zelllinie von *Caenorhabditis elegans*. In *Fakultät für Biologie*, (ed. München: Ludwig-Maximilian-Universität).
- Kaletta, T., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1997). Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **390**, 294-8.
- Kelly, W. G., Xu, S., Montgomery, M. K. and Fire, A.** (1997). Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* **146**, 227-38.
- Kemphues, K. J., Kusch, M. and Wolf, N.** (1988). Maternal-effect lethal mutations on linkage group II of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **120**, 977-86.
- Kemphues, K. J., Wolf, N., Wood, W. B. and Hirsh, D.** (1986). Two loci required for cytoplasmic organization in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **113**, 449-60.
- Kinchen, J. M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R. and Hengartner, M. O.** (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* **434**, 93-99.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y. and Vierstra, R. D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* **278**, 6862-72.
- Kurosu, T., Zhang, F. and Peterlin, B. M.** (2004). Transcriptional activity and substrate recognition of cyclin T2 from P-TEFb. *Gene* **343**, 173-9.
- Leatherman, J. L. and Jongens, T. A.** (2003). Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. *Bioessays* **25**, 326-35.

- Lee, P. S., Chang, C., Liu, D. and Derynck, R.** (2003). Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* **278**, 27853-63.
- Leight, E. R., Glossip, D. and Kornfeld, K.** (2005). Sumoylation of LIN-1 promotes transcriptional repression and inhibition of vulval cell fates. *Development*.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y. Y., Brunicardi, F. C. and Feng, X. H.** (2003a). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* **278**, 31043-8.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y. Y., Brunicardi, F. C., Melchior, F. and Feng, X. H.** (2003b). Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* **278**, 18714-9.
- Marx, J.** (2005). Cell biology. SUMO wrestles its way to prominence in the cell. *Science* **307**, 836-9.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-70.
- Melchior, F.** (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Melchior, F., Schergaut, M. and Pichler, A.** (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* **28**, 612-8.
- Mello, C. C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R. and Priess, J. R.** (1996). The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* **382**, 710-2.
- Moghal, N. and Sternberg, P. W.** (2003). A component of the transcriptional mediator complex inhibits RAS-dependent vulval fate specification in *C. elegans*. *Development* **130**, 57-69.
- Nusslein-Volhard, C., Lohs-Schardin, M., Sander, K. and Cremer, C.** (1980). A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature* **283**, 474-6.
- Panse, V. G., Hardeland, U., Werner, T., Kuster, B. and Hurt, E.** (2004). A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem*.
- Papa, F. R. and Hochstrasser, M.** (1993). The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**, 313-9.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. and Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-20.
- Priess, J. R., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1987). The glp-1 locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* **51**, 601-11.
- Priess, J. R. and Thomson, J. N.** (1987). Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* **48**, 241-50.
- Reddien, P. W. and Horvitz, H. R.** (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* **2**, 131-6.

- Reddien, P. W. and Horvitz, H. R.** (2004). The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 193-221.
- Reese, K. J., Dunn, M. A., Waddle, J. A. and Seydoux, G.** (2000). Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Mol Cell* **6**, 445-55.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. and Gill, G.** (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* **10**, 831-42.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edn.
- Schnabel, R.** (1991). Cellular interactions involved in the determination of the early *C. elegans* embryo. *Mech Dev* **34**, 85-99.
- Schnabel, R.** (1996). Pattern formation: regional specification in the early *C. elegans* embryo. *Bioessays* **18**, 591-4.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. and Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-65.
- Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M.** (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**, 321-8.
- Seydoux, G. and Dunn, M. A.** (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 2191-201.
- Seydoux, G., Mello, C. C., Pettitt, J., Wood, W. B., Priess, J. R. and Fire, A.** (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**, 713-6.
- Seydoux, G. and Strome, S.** (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* **126**, 3275-83.
- Smith, M., Bhaskar, V., Fernandez, J. and Courey, A. J.** (2004). *Drosophila* Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. *J Biol Chem*.
- Starich, T., Sheehan, M., Jadrich, J. and Shaw, J.** (2001). Innexins in *C. elegans*. *Cell Commun Adhes* **8**, 311-4.
- Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E. et al.** (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100-4.
- Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H. and Hirsh, D.** (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **5**, 3484-96.
- Su, H. P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Tramont, A. C., Li, Y., Bu, G., Henson, P. M. and Ravichandran, K. S.** (2002). Interaction of CED-6/GULP, an adapter

- protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* **277**, 11772-9.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Sulston, J. E. and White, J. G.** (1980). Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **78**, 577-97.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T.** (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-74.
- Tenenhaus, C., Schubert, C. and Seydoux, G.** (1998). Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **200**, 212-24.
- Tenenhaus, C., Subramaniam, K., Dunn, M. A. and Seydoux, G.** (2001). PIE-1 is a bifunctional protein that regulates maternal and zygotic gene expression in the embryonic germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **15**, 1031-40.
- Vertegaal, A. C., Ogg, S. C., Jaffray, E., Rodriguez, M. S., Hay, R. T., Andersen, J. S., Mann, M. and Lamond, A. I.** (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* **279**, 33791-8.
- Wilm, T., Demel, P., Koop, H. U., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1999). Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **229**, 31-5.
- Wohlschlegel, J. A., Johnson, E. S., Reed, S. I. and Yates, J. R., 3rd.** (2004). Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Wojcik, C.** (2002). Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* **6**, 25-48.
- Wolpert, L.** (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.
- Wood, W. B.** (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Wu, Y. C. and Horvitz, H. R.** (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* **93**, 951-60.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A.** (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J* **22**, 2047-59.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Ashwell, J. D.** (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-7.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-52.
- Zhang, F., Barboric, M., Blackwell, T. K. and Peterlin, B. M.** (2003). A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes Dev* **17**, 748-58.
- Zhang, H., Saitoh, H. and Matunis, M. J.** (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **22**, 6498-508.

- Zhang, H., Smolen, G. A., Palmer, R., Christoforou, A., van den Heuvel, S. and Haber, D. A.** (2004). SUMO modification is required for in vivo Hox gene regulation by the *Caenorhabditis elegans* Polycomb group protein SOP-2. *Nat Genet* **36**, 507-11.
- Zhao, X., Wu, C. Y. and Blobel, G.** (2004a). Mlp-dependent anchorage and stabilization of a desumoylating enzyme is required to prevent clonal lethality. *J Cell Biol* **167**, 605-11.
- Zhao, Y., Kwon, S. W., Anselmo, A., Kaur, K. and White, M. A.** (2004b). Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem* **279**, 20999-1002.
- Zhou, Z., Hartwig, E. and Horvitz, H. R.** (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**, 43-56.
- Zwaal, R. R., Van Baelen, K., Groenen, J. T., van Geel, A., Rottiers, V., Kaletta, T., Dode, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Bogaert, T.** (2001). The sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase is required for development and muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276**, 43557-63.

Anhang

Abkürzungen

Amp	Ampizillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
L1 – L4	die verschiedenen Larvenstadien von <i>C. elegans</i>
Min.	Minuten
NaAc	Natriumacetat
ORF	„Open Reading Frame“ (Offenes Leseraster)
PCIA	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
rpm	Umdrehung(en) pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec.	Sekunden
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
AB, MS, etc.	Nomenklatur für die einzelnen Zellen im <i>C. elegans</i> -Embryo; den Tochterzellen wird je nach Teilungsrichtung ein a (anterior), p (posterior), l (links) oder r (rechts) angehängt;

Primer

Für Amplifikation des *ulp-1* ORF mit 3'- und 5'-untranslatierten Bereich

CE1289 AAGCATCACCCGTTGCAGTTGTAGG

CE1290 TGCATCCGGTGATTACATTCTCTCC

Sequenzierung des *ulp-1* ORF

CE1340 GAATACTCCACAGTCACTGC

CE1341 GTTAGTCGTCCGATTACTCC

CE1342 GATTCAGCTTCCAAGTAACC

CE1343 TTCGAATCGCCATTGCTCCG

CE1344 TGTCCTTCTCGTATCCGAGC

CE1345 CATACTTCTTCGCTCTGGC

CE1346 TCTTGAGGTTTTGCGGACC

CE1347 ATCTCCTCCGCTTCTATCCC

CE1348 AACACTGTCATCGGGTGTCG

CE1349 TTCCTCTGATCCAGCATTGG

CE1350 CTCTATTAGTGCTGCACCCC

CE1351 TACCTCAGCAACTCTCCTCG

Amplifikation cDNA *ulp-1*

CE1347 ATCTCCTCCGCTTCTATCCC

CE1569 TGATTGCGGCTTACGACACC

Für die ULP-1::GFP

CE1467 AACTATTGGGCCCAGTACCTGAGCGGCGCTTCTAGAAGATTAAGTGTGTC

CE1468 GTACTGGGCCC AATAGTTGCGAGTAACTTCTTCG

Für Amplifikation des *smo-1* ORF mit 3'- und 5'-untranslatierten Bereich

CE1471 TTCTTCGTTGGCCCGTTGATGACGG

CE1472 TTCGTGAAAATCGAGGCGGCAGAGC

smo-1 Sequenzierung gen.DNA

CE1572 TGAGTTGCATTCTCCATAGC

CE1573 AGTGGAAGGGATGGATGG

Für das *smo-1* delta F Konstrukt

CE1737 TGAAGCTTTGTCCTCTACCTACACTCTAATCCG

CE1738 AGAAGCTTGACTATCCGCCCAGCTGCTCTTGG

Für GFP::SMO-1 Konstrukt

CE1578 ACTGGTACCATGCAGGATCCGCTATGGCCGATGATGCAGCTCAAGC

CE1579 AGTGGTACCATCGTTTATAGCGGGAGTCTCTGAAACG

Lebenslauf

Name: Ingo Büssing
Geburtstag: 31.07.1973
Geburtsort: Cloppenburg
Familienstand: verheiratet mit Christina Büssing seit 13.07.2000
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1980 - 1984: Grundschule St. Augustinus, Cloppenburg
1984 - 1986: Orientierungsstufe am Cappelner Damm, Cloppenburg
1986 - 1993: Gymnasium zur Lieben Frau, Cloppenburg
1993: Abitur
1993 - 1994: Zivildienst (Sozialstation, Cloppenburg)
1994 - 1995: Ausbildung zum MTLA, Oldenburg
1995 - 2000: Studium der Biotechnologie, TU Braunschweig
1997: Vordiplom
2000: Diplomarbeit am Institut für Genetik, Arbeitsgruppe Prof. R. Schnabel
mit dem Titel: „Phänotypische und molekulare Analyse der
Pharynxmutante *t1530* in *C.elegans*“
seit 2001: Anfertigung der Dissertation am Institut für Genetik, Arbeitsgruppe Prof.
R. Schnabel
seit 2002: Stipendium des Ministeriums für Wissenschaft und Kultur des Landes
Niedersachsen, Teilnahme am Internationalen Graduiertenkolleg
„Molecular Complexes of Biomedical Relevance“

Publikationen (außerhalb der Doktorarbeit)

Clucas, C., Cabello, J., Bussing, I., Schnabel, R. and Johnstone, I. L. (2002).
Oncogenic potential of a *C.elegans* *cdc25* gene is demonstrated by a gain-of-function
allele. *Embo J* 21, 665-74.

Karabinos, A., Bussing, I., Schulze, E., Wang, J., Weber, K. and Schnabel, R. (2003).
Functional analysis of the single calmodulin gene in the nematode *Caenorhabditis*
elegans by RNA interference and 4-D microscopy. *Eur J Cell Biol* 82, 557-63.